

Dieter Osthoff

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ABBAU DER
L-ASKORBINSÄURE IN WÄSSRIGER LÖSUNG

1965

Frankfurt am Main 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Druck: Bildstelle der J.W. Goethe-Universität
Frankfurt a.M.

Untersuchungen über den Abbau der
L-Ascorbinsäure in wässriger Lösung

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

vorgelegt von

Dieter Osthoff

Frankfurt am Main

1965

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe -Universität
Frankfurt am Main

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Janecke

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Rohmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1965

Tag der Promotion: 26. Juli 1965

Inhaltsübersicht:

Seite:

1	<u>Einleitung</u>	5
1.1	Kurze Charakteristik der L-Ascorbinsäure	5
1.2	Aufgabenstellung	7
2	<u>Chemischer Teil</u>	8
2.1	Einleitung	8
2.2	Allgemeines Verhalten der Untersuchungslösungen	11
2.3	Verfolgung des Abbaus der L-Ascorbinsäure und Bestimmung der dabei auftretenden Abbauprodukte	18
2.4	Prüfung auf weitere Stoffe in den beiden Untersuchungslösungen	58
2.5	Überprüfung von Industriepräparaten	61
2.6	Zeitliche Entstehung der einzelnen Abbauprodukte bei verschiedenen p_H -Werten.	62
2.7	Verfolgung des Abbaus radioaktiv markierter L-Ascorbinsäure ($^{14}C_1$)	65
2.8	Diskussion	68
3.	<u>Versuchsteil</u>	70
3.1	Darstellung der beiden Formen des Furfurol-2,4-Dinitrophenylhydrazons	70
3.2	Darstellung der L-Threonsäure	71
3.3	PC der L-Threonsäure	73
3.4	Überführung der Ketosäure-DNP-Hydrazone in Aminosäuren	74

3.5	Darstellung der Hydroxybrenztraubensäure	75
3.6	Herstellung der DNP-Hydrazon-Ketosäure-methylester	75
3.7	Herstellung des Glykolsäure-4-bromphenazyl-esters	76
3.8	DC von Glykolaldehyd-DNP-Hydrazon	76
3.9	Untersuchung des Niederschlages aus Lösung 2	77
3.10	PC des Glyoxal-DNP-Hydrazon	78
3.11	Bestimmung des Kohlendioxids	78
3.12	Darstellung der L-Dehydroaskorbinsäure	78
3.13	Darstellung der L-Lyxonsäure und L-Xylonsäure	79
3.14	Darstellung der α -Ketobuttersäure	81
3.15	Aufnahme der IR-Spektren	82
3.16	Messung der radioaktiven Abbauprodukte	83
4.	Zusammenfassung	84
5.	Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

1.1 Kurze Charakteristik der L-Ascorbinsäure

Die L-Ascorbinsäure ist als Vitamin C für den Menschen und einige Tiere (z.B. Affe, Meerschweinchen, Präriehund, Reh) unentbehrlich, da diese nicht die Fähigkeit besitzen, dieses Vitamin selbst zu synthetisieren (1), während die meisten anderen Säugetiere es in der Leber bilden können. Bei Amphibien, Reptilien und einigen Vogelarten erfolgt die Synthese der L-Ascorbinsäure^{*)} vornehmlich in der Niere (2). Die AS erhielt ihren Namen wegen ihrer antiskorbutischen Wirkung (3). Der Skorbut ist als Krankheit schon seit der Zeit vor Christi Geburt bekannt; so berichtete z.B. Hippokrates, daß ganze Heere die typischen Erscheinungen des Skorbut (Zahn- ausfall, Schwellungen im Mund, Schmerzen in den Beinen) zeigten. Bei den Kreuzzügen des 13. Jahrhunderts starben mehr Menschen durch Skorbut als in den Kämpfen mit den Sarazenen. Die gleichen Symptome wurden beobachtet, als im Mittelalter die ersten großen Entdeckungsfahrten zur See durchgeführt wurden (Magellan, Vasco da Gama, u.a.).

Über die Heilung des Skorbut gibt es ebenfalls sehr frühe Berichte: man verwendete grünes Blattgemüse und auch Früchte, vor allem Orangen und Zitronen (4). Das erste Mal wurde diese Beobachtung gemacht in der im Jahr 1734 von BACHSTROM ver-

*) Im Laufe der Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

AS	:	L-Ascorbinsäure
DHA	:	L-Dehydroascorbinsäure
DKS	:	2,3-Diketo-L-gulonsäure

öfientlichten Schrift "Observationes circa scorbutum; eiusque indolem, causas, signa et curam." Den gültigen Beweis, daß Skorbut eine Mangelerkrankung ist, erbrachten HOLST und FROELICH im Jahre 1912 (5-7), denen es gelang, ihn experimentell an Meerschweinchen hervorzurufen.

Die Isolierung der AS als kristalline Substanz erfolgte im Jahre 1928 durch SZENT-GYÖRGYI aus Orangen, Kohl und Nebennieren, später auch aus Paprika (8-9); er nannte die wirksame Verbindung Hexuronsäure. Nach unseren heutigen Kenntnissen stellt das Vitamin C die Enolform des 3-Oxo-L-gulonsäure- γ -lactons dar. Kurze Zeit nach der Strukturaufklärung (10-12) im Jahre 1933 berichteten REICHSTEIN (13) und HIRST und Mitarbeiter (14) fast gleichzeitig über die ersten Synthesen. Heute werden auf synthetischem Wege jährlich mehrere Tonnen AS auf der Welt hergestellt.

Es soll an dieser Stelle nicht ausführlich über die AS berichtet, sondern nur noch ihre besondere Eigenschaft, die reduzierende Wirkung (8; 15-17), erwähnt werden. Bei dieser Reaktion wird die AS zu L-Dehydroaskorbinsäure oxydiert. Die AS kann umgekehrt auch aus DHA durch Reduktionsmittel, z.B. Schwefelwasserstoff (18), Glutathion (19,20) und anderen, wieder gewonnen werden. Von dieser Möglichkeit macht man bei der Bestimmung der AS Gebrauch (33).

Eine umfassende Zusammenstellung über den heutigen Stand der Chemie und Physiologie der L-Ascorbinsäure-Forschung findet sich z.B. bei SEBRELL und HARRIS (21).

1.2 Aufgabenstellung

Die AS läßt sich als reduzierbare Substanz leicht zu DHA und weiter zu 2,3-Diketo-L-gulonsäure oxydieren; da jedoch über den Abbau der AS über die DKS hinaus in wässriger Lösung wenig bekannt ist, soll es die Aufgabe dieser Arbeit sein, diejenigen Verbindungen zu identifizieren, welche außer den wenigen bereits bekannten Abbauprodukten noch entstehen.

2	<u>Chemischer Teil</u>	8
2.1	Einleitung	8
2.2	Allgemeines Verhalten der Untersuchungs- lösungen	11
2.2.1	Farbänderung	11
2.2.2	Änderung des P_H -Wertes	12
2.2.3	Untersuchung des Reduktionsver- mögens	14
2.2.4	Bestimmung des L-Askorbinsäure- gehaltes mit N-Bromsuccinimid	16
2.3	Verfolgung des Abbaus der L-Askorbin- säure und Bestimmung der dabei auf- tretenden Abbauprodukte	18
2.3.1	Nachweis der Säuren	19
2.3.1.1	Nachweis der L-Threonsäure	19
2.3.1.2	Nachweis der Glykolsäure	23
2.3.1.3	Nachweis der Oxalsäure	24
2.3.1.4	Nachweis des Kohlendioxids	29
2.3.2	Nachweis der Carbonylverbindungen	31
2.3.2.1	Auftrennung der sauren und neutralen Carbonylverbindungen und Nachweis der sauren Carbonylverbindungen	32
2.3.2.1.1	Nachweis der Hydroxybrenztraubensäure	33
2.3.2.1.2	Nachweis der Brenztraubensäure	38
2.3.2.1.3	Nachweis der Glyoxylsäure	41
2.3.2.2	Nachweis der neutralen Carbonyl- verbindungen	44
2.3.2.2.1	Nachweis des Furfurols	45

2.3.2.2.2	Nachweis des Glyzerinaldehyds	52
2.3.2.2.3	Nachweis des Glykolaldehyds	54
2.3.2.2.4	Nachweis des Glyoxals	57
2.4	Prüfung auf weitere Stoffe in den beiden Untersuchungslösungen	58
2.5	Überprüfung von Industriepräparaten	61
2.6	Zeitliche Entstehung der einzelnen Abbauprodukte bei verschiedenen p_H - Werten	62
2.7	Verfolgung des Abbaus radioaktiv markierter L-Askorbinsäure ($^{14}C_1$)	65
2.8	Diskussion	68

2. Chemischer Teil

2.1 Einleitung

Während die Synthese der AS seit langem bekannt ist und heute im großtechnischen Maßstab durchgeführt wird, ist über deren chemischen Abbau relativ wenig bekannt geworden. Man hat Kenntnis davon, daß die AS leicht oxydiert wird, und man findet hierzu das folgende allgemeine Schema für den Abbau der AS(22) in der Literatur:

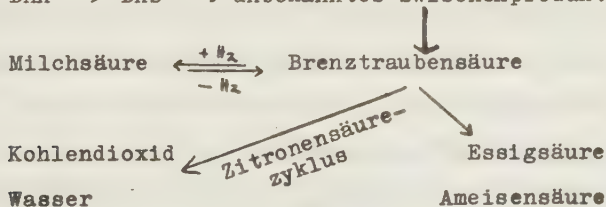


Diese Abbauprodukte wurden nachgewiesen (22,23); man kann jedoch annehmen, daß damit noch nicht alle Zwischenstufen des Abbaus erfaßt worden sind.

Die erwähnten Abbauprodukte der AS wurden sowohl bei dem Abbau in vivo als auch bei demjenigen in vitro gefunden. Die Zahl der Arbeiten über die Veränderung der AS im menschlichen bzw. tierischen Organismus und in pflanzlichen Geweben ist größer als diejenige über die Oxydation der AS außerhalb der Zelle. So fanden z.B. KANFER et al. (24,25), daß sich aus AS in Rattennieren L-Lyxonsäure und L-Xylonsäure bildeten. CURTIN und KING (26) untersuchten den Gehalt der Atemluft an radioaktivem Kohlendioxid sowie den Gehalt des Urins an radioaktiver Oxalsäure bei Ratten, denen AS ($^{14}\text{C}_1$) injiziert worden war. Innerhalb von 24 Stunden nach dieser Applikation wurden 19 bzw. 29 Prozent der AS ($^{14}\text{C}_1$) als Kohlendioxid (^{14}C) und 12 Prozent als Oxalsäure (^{14}C) ausgeschieden.

Japanische Arbeiten (27) verfolgten den Abbau der AS bzw. denjenigen der DHA bei Gegenwart von Mikroorganismen (*Micrococcus varians* Migula). Sie fanden als Abbauprodukte Brenztraubensäure, Milchsäure, Essigsäure und Ameisensäure und gaben den Ablauf der Gesamtreaktion folgendermaßen an:

AS $\rightarrow$ DHA $\rightarrow$ DKS $\rightarrow$ unbekanntes Zwischenprodukt



In dieser Arbeit soll festgestellt werden, welche Verbindungen bei der Alterung einer wässrigen AS-Lösung auch bei Zusatz

von Kupfer(II)-ionen entstehen. Die Zugabe der Kupferverbindung erfolgte, weil bekannt ist, daß sie den Abbau der AS fördert. Der Zusatz von Kupfer als Oxydationsmittel ist auch pharmazeutisch von Interesse, da zahlreiche Kombinationspräparate mit Vitaminen und Mineralien gleichzeitig AS und Kupfer enthalten. In Lebensmitteln bewirken schon Spuren von Kupfer(II)ionen eine deutliche Verminderung des AS-Gehaltes (28).

Es wurde absichtlich eine größere Menge Kupfersulfat zugesetzt, um eine schnellere Umsetzung zu erzielen. Da bei dieser Arbeitsweise die Gefahr bestand, daß infolge der schnellen Reaktionsfolge einige Zwischenprodukte nicht nachweisbar sein würden, diente eine reine wässrige AS-Lösung zur Kontrolle.

Zu diesem Zweck wurden daher zwei verschiedene wässrige Lösungen angesetzt: eine Lösung, die 1% AS (= 56,7 mMol) in bidest. Wasser enthielt, ferner eine Lösung, der außer der AS (1%, = 56,7 mMol) noch 0,5% Kupfersulfat ($\text{Cu } 50 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; = 20,1 mMol) zugegeben wurden.

Die Aufbewahrung beider Lösungen erfolgte bei Tageslicht in Erlenmeyerkolben, die so verschlossen waren, daß Luftzutritt möglich war, Verunreinigungen jedoch verhindert wurden. Diese Lösungen dienten zur Untersuchung, und es konnten daraus die später beschriebenen Verbindungen nachgewiesen werden. Diese sollen in den folgenden Abschnitten nach abnehmender Molekülgröße behandelt werden, d.h. in umgekehrter Reihenfolge des Systems von HILL (29).

2.2 Allgemeines Verhalten der Untersuchungslösungen.

2.2.1 Farbänderung

Da beide Lösungen^{*)} innerhalb des Beobachtungszeitraumes (etwa 2 Jahre) charakteristische Veränderungen in ihrer äußeren Beschaffenheit zeigten, konnte auf eine tiefgreifende Veränderung des AS-Moleküls geschlossen werden. Die anfangs farblose Lsg. 1 färbte sich nach etwa drei Monaten gelb und war nach einem halben Jahr braungelb gefärbt. Mit der Farbänderung parallel gehend trat ein intensiver bouillonartiger Geruch auf. Ähnlich Farbveränderungen werden schon von LAMBEN und HARRIS beschrieben (30).

Die Lsg. 2 wurde durch die Zugabe des Kupfersulfats blaugrün gefärbt; daher konnten die bei Lsg.1 beschriebenen Farbveränderungen hier nicht so deutlich beobachtet werden. Es bildete sich bald ein gelbroter Niederschlag von Kupfer(I)oxid, der nach drei Tagen abfiltriert wurde; das Filtrat hatte zu dem Zeitpunkt noch eine schwach blaugrüne Farbe. Im Laufe der Zeit änderte sich der Farbton immer mehr und nahm schließlich die schon bei Lsg.1 erwähnte braungelbe Farbe an.

In gleicher Weise wie bei Lsg.1 trat auch hier ein typisch bouillonartiger Geruch auf; außerdem bildete sich nach etwa 6 Monaten in zunehmendem Maße ein graugrüner Niederschlag, der

*) Es sollen folgende Abkürzungen gelten:

Lsg. 1 für die reine AS-lösung

Lsg. 2 für die AS-lösung mit Kupfersulfatzusatz

bei der späteren Untersuchung als Kupfer(II)oxalat erkannt wurde.

2.2.2 Änderung des p_H - Wertes.

Es ist anzunehmen, daß sich bei dem Abbau der AS unter den gewählten Bedingungen Säuren mit niedrigerer Kohlenstoffzahl und Dicarbonsäuren bilden, und daß sich infolgedessen der Säuregrad verändern wird. Bei Untersuchungen, die nicht besonders angeführt werden sollen, konnte festgestellt werden, daß der Säuregrad sich tatsächlich erhöht: es war also mit der Bildung von Verbindungen zu rechnen, die stärker saure Eigenschaften aufweisen als die AS.

In diesem Zusammenhang war von Interesse, festzustellen, ob die Wasserstoffionenkonzentration zunimmt; es wurden daher p_H -Wert-Messungen durchgeführt.

In den jeweils frisch hergestellten Lösungen 1 und 2 änderte sich der p_H -Wert langsam nach der sauren Seite hin; die Messung erfolgte mit Glaselektroden^{*)}. Versuchsansätze und Meßergebnisse sind in Abbildung 1 zusammengestellt. Man erkennt eine deutliche Abnahme des p_H -Wertes; die Art der Aufbewahrung der beiden Lösungen (im Tageslicht oder im Dunkeln) ist ohne besonderen Einfluß.

^{*)} Einstab-Meßkette "Ingold" Typ 405-90 unter Verwendung eines Röhrenvoltmeters der Fa.Knick.

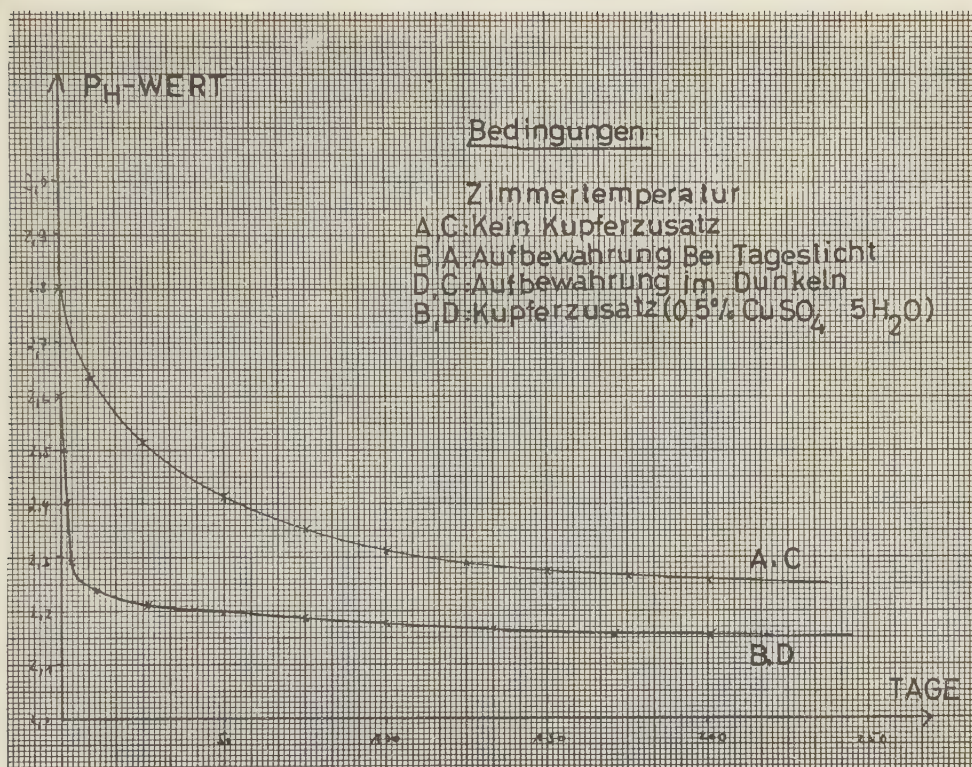


Abb. 1

Veränderung des p_H-Wertes bei der Lagerung der
Lösungen 1 und 2.

Der Grund für die Verschiebung des p_H - Wertes nach der sauren Seite hin wird in der Weise gedeutet, daß einige Abbauprodukte in den gealterten Lösungen, z.B. Oxalsäure und Glykolsäure, eine größere Dissoziationskonstante aufweisen als die AS selbst (31).

2.2.3 Untersuchung des Reduktionsvermögens.

Die AS ist als stark reduzierend wirkende Verbindung bekannt, und es war deshalb von Interesse, festzustellen, ob sich das Reduktionsvermögen beim Altern von Lsg. 1 und Lsg.2 ändert.

Die zeitliche Kontrolle des Reduktionsvermögens frisch hergestellter AS-Lösungen bereitete keine Schwierigkeiten; die Titration erfolgte mit 0,1 n Jodlösung und Stärkelösung als Indikator nach den Angaben des DAB VI, 3. Nachtrag 1959 (32). Wie zu erwarten war, nahm das Reduktionsvermögen beim Altern der Lösungen 1 und 2 ab; die Art der Aufbewahrung (im Tageslicht und im Dunkeln) hatte keinen Einfluß, bei den mit Kupfer(II)ionen oxydierten Lösungen erfolgte die Abnahme des Reduktionsvermögens schneller als in den reinen AS-Lösungen (Abb. 2).

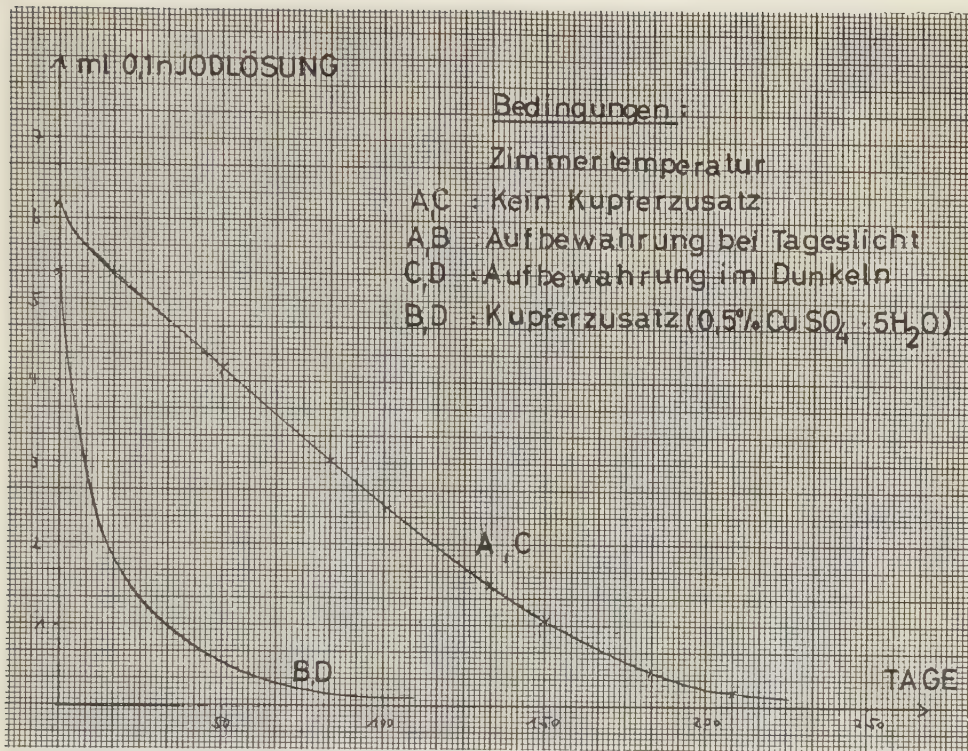


Abb. 2

Veränderung des Reduktionsvermögens gegenüber 0,1n Jod-
lösung bei der Alterung der Lösungen 1 und 2.

2.2.4 Bestimmung des L-Ascorbinsäuregehaltes mit N-Bromsuccinimid.

Das Reduktionsvermögen der AS wird auch zu deren Bestimmung herangezogen. Es sind jedoch, z.B. bei der häufig angewendeten Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol (33), unter Umständen durch andere reduzierende Substanzen Fehler möglich. Da außerdem bei dieser Methode die Erkennung des Endpunktes in gefärbten Lösungen schwierig und die Bestimmung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (34) für Reihenuntersuchungen nicht geeignet ist, wurde das Verfahren von BARAKAT (35,36) angewandt: mit Hilfe von N- Bromsuccinimid konnte der Abbau der AS gut verfolgt werden.

Obwohl diese Methode als für AS recht spezifisch gilt, wurde zur Kontrolle ein Gemisch der authentischen Abbauprodukte nach deren Identifizierung zusammengestellt und in wässriger Lösung ebenfalls mit N-Bromsuccinimid titriert. Da ein Verbrauch des Oxydationsmittels nicht beobachtet werden konnte, war diese Methode unter den vorliegenden Bedingungen für die Bestimmung der AS gut geeignet.

Die Ergebnisse der Kontrolle des AS-Gehaltes in den alternierenden Lösungen 1 und 2 sind in Abb. 3 wiedergegeben; in der Lsg. 1 waren nach 120 Tagen noch 6%, in der Lsg. 2 waren bereits nach 15 Tagen nur noch 3% der ursprünglich vorliegenden Menge an AS vorhanden.

Das zeitliche Verschwinden der AS wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben: aus diesem Grunde wurde

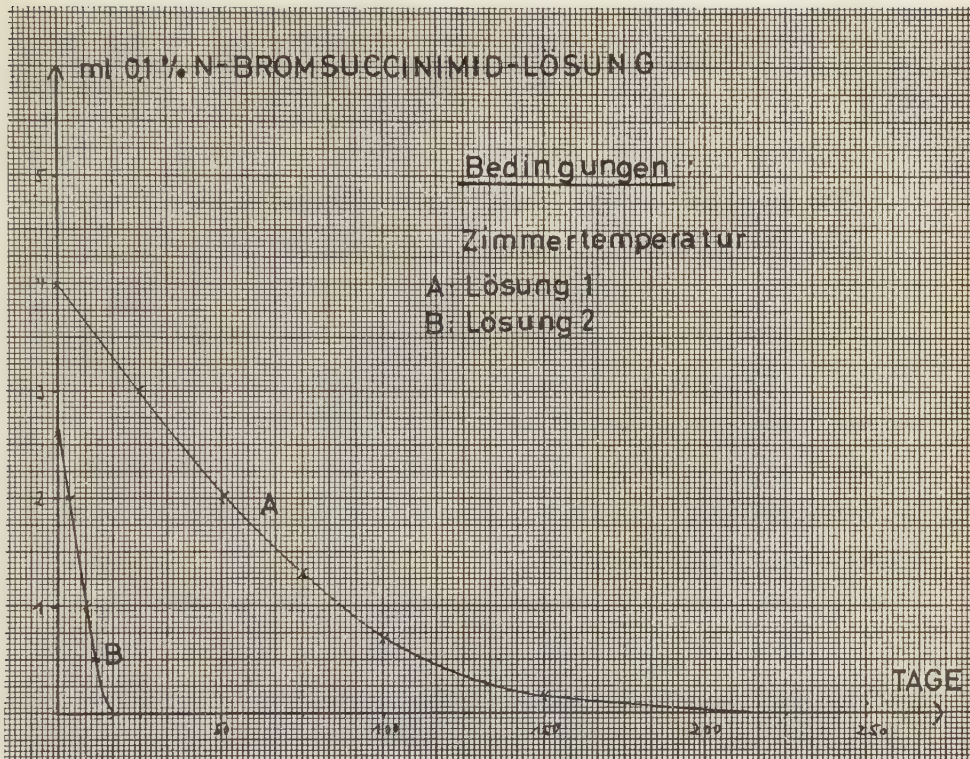


Abb. 3

As-bestimmungen mit N-Bromsuccinimid in alternden
Lösungen 1 und 2.

untersucht, ob in den vorliegenden Lösungen ähnliche Verhältnisse herrschen.

2.3 Verfolgung des Abbaus der L-Ascorbinsäure und Bestimmung der dabei auftretenden Abbauprodukte.

Es ist bekannt, daß die AS leicht oxydierbar ist und somit leicht Veränderungen unterliegt, die sie für den Organismus unwirksam machen. Diese Eigenschaft ist pharmazeutisch von großer Bedeutung, da dieses Vitamin in zahlreichen Präparaten mit verschiedenen Indikationen, besonders aber in Multivitaminpräparaten, enthalten ist.

Im folgenden sollen der Nachweis und die Identifizierung der Verbindungen beschrieben werden, die sich aus den beschriebenen Untersuchungslösungen im Laufe der Beobachtungszeit (etwa 2 Jahre) bildeten. Alle Abbauprodukte wurden in den bereits erwähnten Lösungen 1 und 2 nachgewiesen; eine andere Behandlung erfolgte nicht.

Die Oxydation der AS zu DHA und weiter zu DKS ist schon oft Gegenstand einer Bearbeitung gewesen. Der Nachweis der DHA und der DKS gelang chemisch und pc. Die Angaben der früheren Untersucher, über die eine Literaturzusammenstellung von HERRMANN und ANDRAE (37) unterrichtet, konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bei der Oxydation der AS in Gegenwart von Kupfer(II)ionen zeigt sich eine spontane Gasentwicklung (Kohlendioxid), die vermuten läßt, daß Ver-

bindungen mit fünf und weniger Kohlenstoffatomen als Abbau-
produkte auftauchen. Ferner liegt die Annahme nahe, daß neben
der DKS noch weitere Ketosäuren gebildet wurden.

Die in den beiden alternden Lösungen 1 und 2 gefundenen
Verbindungen werden bei der folgenden Besprechung in Säuren
und Carbonylverbindungen unterteilt, letztere noch einmal
in saure und neutrale Bestandteile unterschieden. Die Be-
schreibung der einzelnen Gruppen beginnt mit den Säuren; es
folgen die sauren und anschließend die neutralen Carbonylver-
bindungen. Innerhalb dieser Verbindungsklassen werden die ein-
zelnen Bestandteile in umgekehrter Reihenfolge des Systems
von HILL (29) behandelt, d.h. nach abnehmender Molekülgröße.

2.3.1 Nachweis der Säuren.

Auf die Beschreibung der Nachweise der DHA und DKS soll ver-
zichtet werden, da diese Verbindungen schon oft von mehreren
anderen Untersuchern identifiziert wurden (37). Es soll des-
halb zunächst über den Nachweis der L-Threonsäure berichtet
werden.

2.3.1.1 Nachweis der L-Threonsäure.

Es zeigte sich im Laufe der Untersuchung der Probelösungen
(Lösungen 1 und 2), daß die L-Threonsäure das einzige nachweis-
bare Abbauprodukt mit 4 Kohlenstoffatomen ist. Sie entsteht bei
der Oxydation der AS mit Kupfersulfat schon nach etwa 1-2 Tagen.

Sie ist als Abbauprodukt der AS bereits bekannt (38,22). Ihr Nachweis erfolgte durch Oxydation mit Salpetersäure zur L-Weinsäure (39), wodurch gleichzeitig auch ihre Konfiguration geklärt wurde.

Die Identifizierung aus den Reaktionsgemischen dieser Arbeit erfolgte p c mit dem Fließmittel Essigsäureäthylester-Essigsäure-Wasser (40). Das Sichtbarmachen gelang entweder durch längeres Erhitzen auf 150 bis 160°C (41) oder durch Besprühen mit Schweppe's Reagenz (42), wobei in Umkehrung der bekannten Zuckerreaktion anstelle von Phthalsäure bzw. Phosphorsäure das Anilin mit einer Lösung von Xylose (oder Glukose) gemischt wurde. Es bildeten sich je nach der Threonsäurekonzentration gelbe bis braune Flecke auf gelblichem Untergrund, Als Vergleich diente eine Lösung der Threonsäure, die aus alkalischer Xyloselösung hergestellt worden war (43,44) (Abb. 4). Außer diesem pc Nachweis zeigte die Threonsäure, aus mehreren Papierchromatogrammen mit Wasser eluiert, die gleichen nicht spezifischen Vorproben wie die Weinsäure. Folgende Reaktionen waren positiv: Komplexbildung mit Kupfer(II)ionen, Verhalten gegenüber Schwefelsäure beim Erwärmen.

Es tauchten hiernach Zweifel auf, ob wirklich Threonsäure vorliegt oder ob die positiven Vorproben in den Reaktionslösungen durch Weinsäure hervorgerufen würden. Es mußte somit noch die endgültige Klärung angestrebt werden. Als Methode bot sich hier das Verfahren von DRAKE und SWEENEY (45) an, die die Herstellung des p-Phenylphenazylesters in ähnlichen Fällen empfehlen.

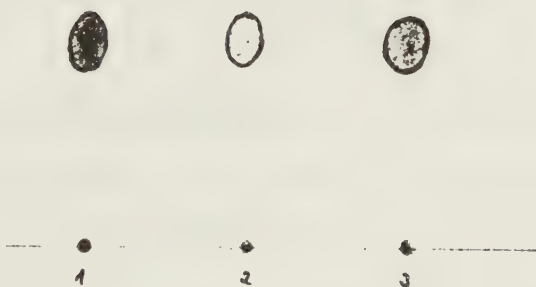


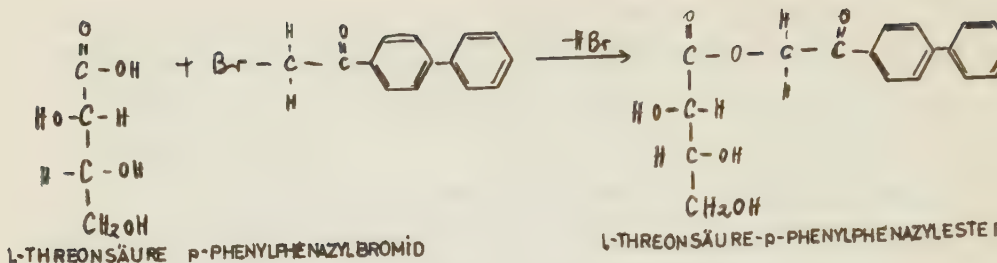
Abb. 4

PC von Threonsäure

Methodik: aufsteigend

Fließmittel: Essigester-Essigsäure-Wasser
(10 : 1,3 : 1)

Erklärung: 1 Analyse
2 Authentischer Vergleich
3 Mischchromatogramm 1 und 2



Die als Vergleichssubstanz verwendete Threonsäure wurde nach dem Verfahren von v. VARGHA (46) aus AS gewonnen. Hierbei werden die Hydroxylgruppen des AS - Moleküls durch die Einführung von Isopropylidenresten geschützt. Durch Oxydation mit Kaliumpermanganat bildete sich Kaliumisopropylidenthreonat, dessen Kation auf einem stark sauren Ionenaustauscher (MERCK I) gegen Wasserstoff ausgetauscht wird. Durch Erhitzen dieser Lösung mit Salzsäure entsteht die freie Säure, die sich im Vakuum ohne Zersetzung nur zu einer gelblichen, dickflüssigen Lösung konzentrieren läßt.

Die Analysen-Proben zur Untersuchung auf Threonsäure wurden aus den Lösungen 1 und 2 , wie bereits beschrieben, pc gewonnen. Die aus zahlreichen Chromatogrammen eluierte wässrige Lösung ließ sich im Vakuum zu einer ähnlich aussehenden, dickflüssigen Masse einengen wie die Vergleichsprobe.

Die Veresterung mit p-Phenylphenazylbromid (F=124,5-125,5°C) erfolgte nach dem Verfahren von DRAKE und SWEENEY (45) nach dem Neutralisieren der Säure mit Natronlauge, in heißer alkoholischer Lösung, aus der die Ester beim Erkalten ausfallen.

Die Veresterung der Vergleichsprobe führte in einem Arbeitsgang zu einem farblosen Produkt, dessen Schmelzpunkt ($F = 102-103^{\circ}\text{C}$) sich auch beim Umkristallisieren aus Alkohol nicht mehr änderte. Bei den Analysenproben war dreimaliges Umkristallisieren erforderlich; die Kristalle wiesen dann ebenfalls den gleichen Schmelzpunkt ($F = 102-103^{\circ}\text{C}$) auf. Hiermit war der Beweis erbracht, daß es sich nicht um Weinsäure handeln konnte, denn deren Ester mit p-Phenylphenazylbromid schmilzt bei $203-204^{\circ}\text{C}$ (45). Damit war die Anwesenheit von L-Threonsäure in beiden Lösungen erwiesen.

2.3.1.2 Nachweis der Glykolsäure.

Bei der p c Untersuchung der gealterten Lösungen tauchte beim Besprühen mit Schweppe's Reagenz ein weiterer Fleck auf, der nach unseren Überlegungen von Glykolsäure herrühren könnte. Es wurde daher dieser Beobachtung nachgegangen und versucht, den Nachweis von Glykolsäure zu liefern. In diesem Fall konnte genau so wie bei der Threonsäure vorgegangen werden. Als Verteilungsmittel für die P C wurde das Gemisch Essigester - Essigsäure-Wasser (10 : 1,3 : 1) eingesetzt.

Es soll jedoch hervorgehoben werden, daß die Farbreaktion mit 3,7- Dihydroxynaphthalin und Schwefelsäure (47) anstelle des erwarteten rotvioletten Farbstoffes einen dunkelgrünen ergab. In diesem Falle scheint die Farbreaktion durch die Anwesenheit von Threonsäure gestört worden zu sein. Auch die Herstellung des schwer löslichen Kaliumsalzes (48) gelang

nicht. Dieser Mißerfolg lag an einer zu geringen Konzentration der Glykolsäure für die Reaktion.

Mit Hilfe der präparativen PC wurde die Säure angereichert, bis schließlich etwa 0,4 g einer gelblich gefärbten sirupösen Masse vorhanden waren. Diese Substanz ließ sich in bequemer Weise mit 4-Bromphenazylbromid (49) verestern. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus 90%igem Alkohol konnte ein Schmelzpunkt von $137 - 139^{\circ}\text{C}$ festgestellt werden. Das 4-Bromphenazylglykolat, das als Vergleich aus einer authentischen Probe Glykolsäure hergestellt worden war, ergab einen Schmelzpunkt von 139°C . Der Mischschmelzpunkt beider Substanzen lag bei 139°C ; eine Depression fand nicht statt.

Die Anwesenheit von Glykolsäure konnte damit als bewiesen angesehen werden. Es soll besonders hervorgehoben werden, daß diese Verbindung in der mit Kupfersulfat versetzten sowie in der kupferfreien AS-lösung gefunden werden konnte.

2.3.1.3. Nachweis der Oxalsäure.

Die Bildung von Oxalsäure beim Abbau der AS ist schon lange bekannt. Bei Versuchen in vivo und in vitro wird diese Verbindung gebildet (26,22). Sie kann neben Kohlendioxid als Endprodukt des L-Ascorbinsäureabbaus angesehen werden, und man hat sogar aus ihrer Bildung eine gewisse Giftigkeit der AS ableiten wollen.

Der Nachweis der Oxalsäure bereitete keine besonderen Schwierigkeiten, da uns die analytische Chemie hierfür gute Möglich-

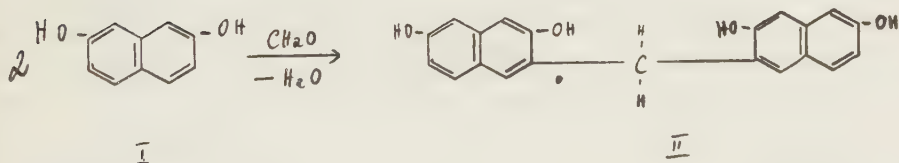
keiten bietet. Es wurden im einzelnen die folgenden Reaktionen und chromatographischen Methoden durchgeführt:

- 1) Bildung von schwerlöslichem Calciumoxalat aus essigsäuren, mit Ammoniumazetat gepufferten Lösungen 1 und 2. Die Calciumoxalatniederschläge wurden mit dest. Wasser ausgewaschen, getrocknet und für folgende Identifizierungsreaktionen verwendet:

a) Reduktion zu Glykolsäure (50).

Ein wenig dieses Calciumoxalates wurde in warmer Schwefelsäure gelöst, und ein Tropfen dieser Lösung wurde mit Magnesium reduziert. Nach dem Lösen des Magnesiums erfolgte die Zugabe von 2,7-Dihydroxynaphthalin in Schwefelsäure; es trat nach 15 minütigem Erhitzen im siedenden Wasserbad eine violettrote Farbe auf.

Diese Farbreaktion beruht wahrscheinlich auf der Kondensation von Formaldehyd (aus Glykolsäure durch die Einwirkung der Schwefelsäure gebildet) mit 2,7-Dihydroxynaphthalin (I) in o-Stellung zu den Hydroxylgruppen (50):



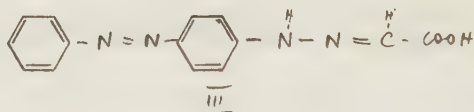
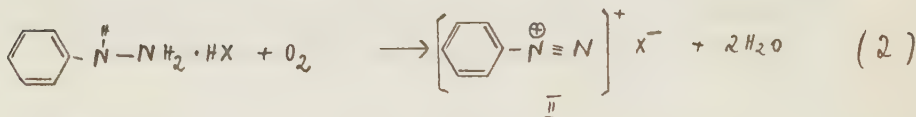
Das hierbei gebildete Tetrahydroxydinaphthylmethan (II) ist farblos und wird von der Schwefelsäure zu einem violettroten Farbstoff oxydiert, dessen Konstitution unbekannt ist.

b) Reduktion zu Glyoxylsäure (51).

Eine kleine Probe Calciumoxalat wurde in ähnlicher Weise (mit Zink) reduziert, wie unter a). Glyoxylsäure bildet

sich bei der Reduktion von Oxalsäure vor der Glykolsäure. Deshalb wurde hier nur kurz reduziert. Ein Tropfen dieser Glyoxylsäure und ein Tropfen einer frisch bereiteten Phenylhydrazinhydrochloridlösung wurden gemischt und zur Trockne verdampft; bei Zugabe kleiner Mengen konz. Salzsäure und Wasserstoffperoxid (3%) entstand sofort eine rote Farbe.

Der Mechanismus dieser Reaktion ist nicht genau bekannt; es erscheint jedoch möglich, daß sich Glyoxylsäurephenylhydrazon (I) bildet, daß Phenylhydrazin in ein Diazoniumsalz (II) übergeführt wird und daß der gebildete rote Farbstoff durch Kupplung von I und II entsteht und die Struktur einer Azoverbindung (III) aufweist:

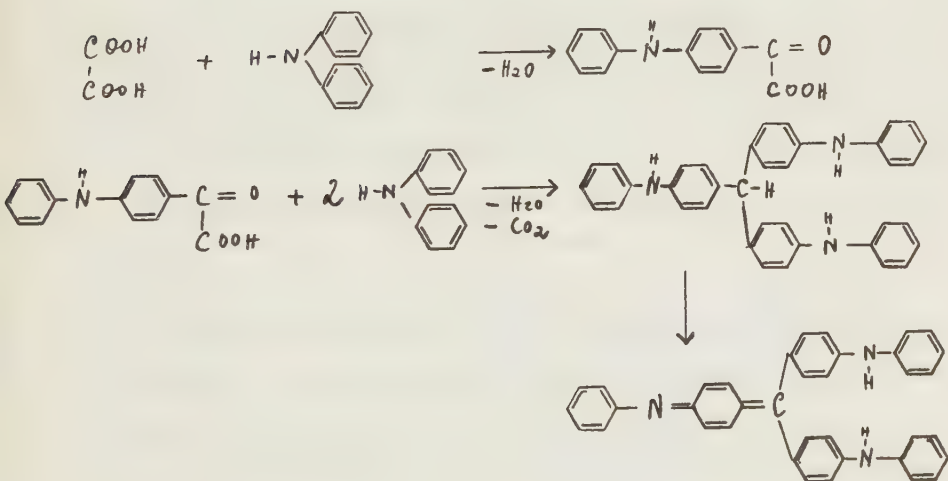


Diese Reaktion ist recht spezifisch für Glyoxylsäure; es stört jedoch Glykolsäure, die durch Wasserstoffperoxid oxidiert werden kann und dann mitreagiert. Da aber Glykolsäure und Glyoxylsäure unter den für Oxalsäure beschriebenen Fällungsbedingungen nicht mit Calciumsulfatlösung reagieren, das als Ausgangsprodukt verwendete Calciumoxalat also frei von diesen Bestandteilen war, können die Reaktionen unter a) und b) als Beweis für die Anwesenheit von Oxalsäure dienen. Ein Kontrollversuch ergab, daß sich Glykolsäure und Glyoxylsäure

nicht mit Calciumionen unter den erwähnten Bedingungen umsetzen.

c) Bildung von Anilinblau (52).

Durch Zugabe eines Tropfens sirupöser Phosphorsäure und von wenig festem Diphenylamin zu einer kleinen Probe Calciumoxalat und Erhitzen dieser Mischung auf 250°C bildet sich ein blauer Farbstoff, Anilinblau. Diese Reaktion kann als spezifisch für Oxalsäure angesehen werden. Sie setzt sich aus zwei Kondensationsreaktionen (1,2) und einer Oxydationsreaktion (3) zusammen:



2) Für den Nachweis der Oxalsäure eigneten sich neben den erwähnten Reaktionen, bei denen das Calciumsalz als Ausgangsprodukt diente, die p c Verfahren von WOLLMANN und POHLOUDEK-FABINI (53) für den direkten Nachweis aus den Lösungen 1 und 2 am besten. Auch auf der Dünnschichtplatte ließ sich die Oxalsäure chromatographieren, es wurden verschiedene Fließmittel verwendet und als Sorbentien dienten Kieselgel G MERCK (54) und ein Gemisch aus Kieselgur G MERCK und Polyäthylenglykol 1000 (55). Die Chromatogramme ergaben eine gute Übereinstimmung zwischen den Analysen- und Vergleichsproben.

Wie anfangs bereits erwähnt wurde (s. Seite 11), bildete sich in Lösung 2 allmählich in zunehmendem Maße ein grau-grüner Niederschlag. Bei seiner Elementaranalyse wurden Kupfer, Sauerstoff, Wasserstoff und Kohlenstoff gefunden. Da Kupferionen mit organischen Säuren lösliche Komplexsalze bilden können, wie z.B. in der Fehling'schen Lösung, wurde Kupferoxalat vermutet. Die Anwesenheit von Wasserstoff erklärt sich durch einen wechselnden Gehalt von Kristallwasser im Kupferoxalat (56,57). Es lag also nahe, durch eine quantitative Kupferbestimmung und eine quantitative Oxalatbestimmung diesen Niederschlag als Kupferoxalat zu identifizieren (58,59). Die Ergebnisse der Analyse und einer selbst hergestellten Vergleichsprobe zeigten folgende Werte:

	Kupfer	Oxalat
Analysenprobe aus Lsg. 2	42%	57,8%
Vergleichsprobe	41,2%	58,0%

Da die Werte gut übereinstimmen, kann die Anwesenheit von Oxalsäure als Kupferoxalat in Lösung 2 als erwiesen angesehen werden.

Da außerdem die bereits beschriebenen Nachweise der Oxalsäure aus den beiden Untersuchungslösungen geführt werden konnten, ist ihre Anwesenheit in den gealterten AS-Lösungen mit Sicherheit bewiesen.

2.3.1.4 Nachweis des Kohlendioxids.

Es konnte gezeigt werden, daß bei dem Abbau des Moleküls der AS Verbindungen mit einer geringeren Anzahl an C - Atomen entstehen, und es lag daher der Gedanke nahe, auch zu prüfen, ob sich nicht während der Veränderung der AS Kohlendioxid bildet. Da nach der Zerstörung der AS die Oxalsäure unverändert in den Lösungen 1 und 2 erhalten bleibt, d.h. Kohlendioxid hieraus nicht mehr entstehen kann, muß vor der Entstehung von Oxalsäure auf Kohlendioxid geprüft werden.

Auch im tierischen Organismus wurde die Bildung von Kohlendioxid aus AS beobachtet: es wurde nach der Applikation von radioaktiver AS ($^{14}\text{C}_1$) in der Atemluft der für den Versuch verwendeten Ratten radioaktives Kohlendioxid gefunden (26). Es ist jedoch möglich, daß der Abbau hier über einen anderen Weg verläuft, da mit der Beeinflussung durch Enzyme zu rechnen ist.

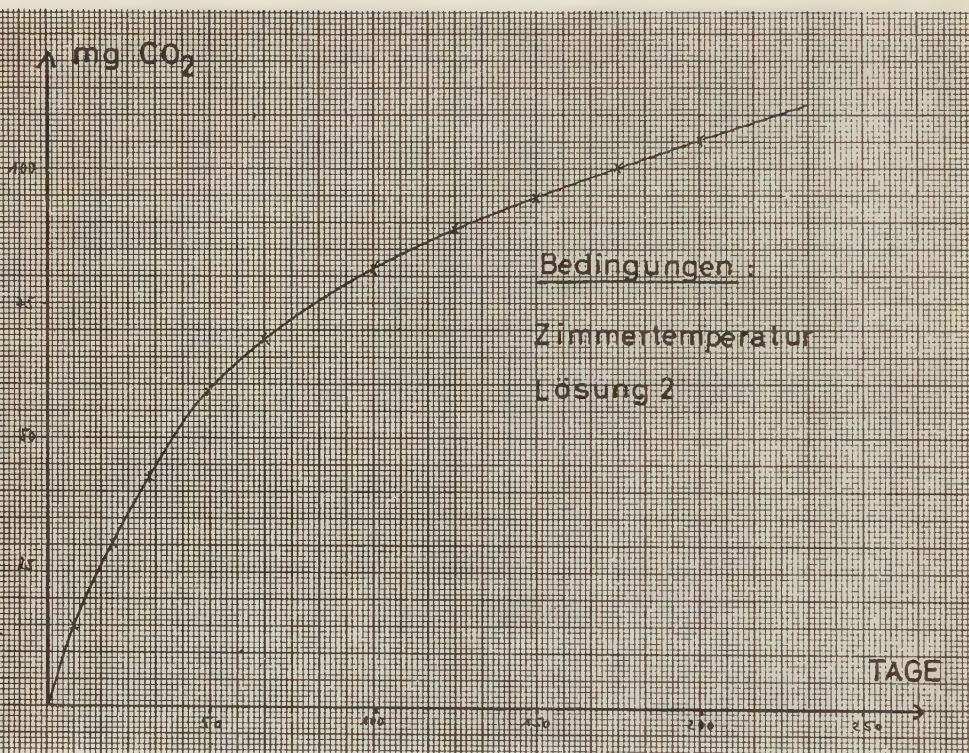


Abb. 5

Bildung von Kohlendioxid bei der Oxydation
der AS mit Kupfer(II)sulfat.

Der Nachweis des bei der Oxydation von wässrigen AS-Lösungen gebildeten Kohlendioxids erfolgte durch Absorption an Natronasbest (60). Der qualitative Beweis für die Anwesenheit von Kohlendioxid konnte in einfacher Weise durch die Veränderung von Barytwasser erbracht werden.

Der qualitativen Untersuchung schloß sich die quantitative Bestimmung an, die durch Absorption an Natronasbest erfolgte: das getrocknete Kohlendioxid wurde mit strömendem, gereinigtem Stickstoff durch ein mit Natronasbest gefülltes U-Rohr geleitet, welches in bestimmten Zeitabständen gewogen wurde (60). Die anfangs ziemlich starke Entwicklung von Kohlendioxid nahm im Laufe der Beobachtungszeit (ca. 8 Monate) kontinuierlich ab. Das Ergebnis ist in Abb. 5 graphisch dargestellt, die Reaktionszeit ist aus der Abb. 5 zu entnehmen.

2.3.2 Nachweis der Carbonylverbindungen.

Die Anwesenheit von DKS in oxydierten AS-Lösungen ist bereits lange bekannt. Auf der Reaktion dieser Dicarbonylverbindung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin^{*)} beruht die quantitative Bestimmungsmethode der AS, DHA und DKS nach ROE und KUETHER (34). Es war daher von Interesse, festzustellen,

*) Es sollen folgende Abkürzungen gelten:

DNP-Hydrazin für 2,4-Dinitrophenylhydrazin

DNP-Hydrazon für ein 2,4-Dinitrophenylhydrazon z.B.

Furfurol-DNP-Hydrazon

ob sich in den gealterten Untersuchungslösungen 1 und 2 weitere Carbonylverbindungen gebildet hatten. Hierauf deuteten die Veränderung der Farbe und der bouillonartige Geruch hin. In einem orientierenden Vorversuch konnte nachgewiesen werden, daß Verbindungen dieser Art vorlagen, die bei der Zugabe von DNP-Hydrazin an den Lösungen 1 und 2, in denen nach TILLMANS (33) und BARAKAT (35,36) keine AS mehr vorhanden war, eine deutliche Fällung ergaben. Diese positive Reaktion konnte durch Aldehyde, Ketone, Ketosäuren oder Aldehydsäuren hervorgerufen worden sein. Da sich 2,4 Dinitrophenylhydrazone recht gut für die chromatographische Analyse wegen ihrer Eigenfarbe eignen, wurden diese Derivate für die Identifizierung der Carbonylverbindungen herangezogen.

2.3.2.1 Auftrennung der sauren und neutralen Carbonylverbindungen und Nachweis der sauren Carbonylverbindungen.

Bei vorbereitenden p c und d c Untersuchungen von Fällungsproben mit DNP-Hydrazin aus Lsg. 1 und Lsg. 2 konnte die Anwesenheit mehrerer DNP-Hydrazin-Verbindungen nachgewiesen werden. Da die Möglichkeit bestand, daß sowohl saure (Ketosäuren, Aldehydsäuren) als auch neutrale 2,4-Dinitrophenylhydrazone (Ketone, Aldehyde) vorlagen, erschien es sinnvoll, vor der Identifizierung der einzelnen Bestandteile eine Auftrennung dieser beiden Gruppen durchzuführen.

Hierfür erwies sich der Ionenaustauscher MERCK IV (stark basisch) als am besten geeignet: über eine Säule dieses Ionenaustauschers wurden größere Mengen der gealterten Lösungen 1 und 2 geschickt. Im Filtrat befanden sich die neutralen Carbonylverbindungen; die auf der Säule verbliebenen Säuren konnten mit verdünnter Salzsäure (1%) ausgewaschen werden. Es resultierten bei dieser Trennung zwei Filtrate je Untersuchungslösung, die, mit einem Überschuß an DNP-Hydrazin-Lösung (61) versetzt, 24 Std. lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurden, um eine quantitative Ausfällung zu erzielen.

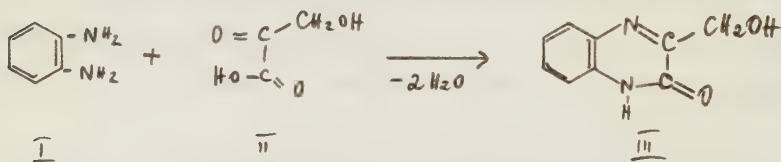
Die orientierenden pc und dc Untersuchungen ergaben, daß beide Niederschläge aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt waren. Es soll zunächst über die vorhandenen sauren Carbonylverbindungen berichtet werden.

2.3.2.1.1 Nachweis der Hydroxybrenztraubensäure.

Wie bereits erwähnt, wurde die typische Geruchbildung in den alternden Untersuchungslösungen 1 und 2 als Hinweis für die Bildung von Ketosäuren gewertet. Da die als Oxydationsprodukt der AS bekannte DKS jedoch geruchlos ist, mußten sich unter Verkleinerung des Moleküls der AS Bruchstücke mit einer geringeren Zahl von C-Atomen gebildet haben. Eine solche Verbindung wird von WIELAND und WIEGANDT (62) beschrieben, die α -Ketobuttersäure als Träger des charakteristischen Bouillongeruches bei der Spaltung von

Threonin nachwiesen. Der Versuch, α -Ketobuttersäure auch in den oxydierten AS-Lösungen festzustellen, verlief jedoch negativ. Da die Anwesenheit von Hydrobrenztraubensäure vermutet wurde, erstreckte sich die Untersuchung zunächst auf diese Verbindung.

Bei der direkten pc Untersuchung der Lösungen 1 und 2 war die Verwendung von o-Phenylendiamin günstig (63): o-Phenylendiamin(I) bildet in der Hitze mit α -Ketosäuren(II) Chinoxalinderivate(III), die bei der Betrachtung im UV-Bereich gelbgrün fluoreszieren und deren Bildung nach WIELAND und FISCHER (63) folgender Gleichung folgt:



Außer mit o-Phenylendiamin war der Nachweis der Ketosäuren auch mit Semicarbazid möglich (64): die besprühten Chromatogramme fluoreszierten im UV-Bereich, und nur an den Stellen, an denen sich Ketosäuresemicarbazone gebildet hatten, wurde die Fluoreszenz gelöscht.

Diese direkten Verfahren können jedoch wegen der durch die anderen Bestandteile der Lösungen verursachten Störungen höchstens als qualitative Vorproben gelten. Bei der pc und dc Untersuchung der Ketosäure-DNP-Hydrazone gelang es trotz Anwendung verschiedener Fließmittelsysteme

(65-70) nicht, eine zufriedenstellende Trennung zu erzielen. Es mußte daher nach anderen Trennungsmöglichkeiten für diese verwandten Substanzen gesucht werden.

Die Überführung der Ketosäure-DNP-Hydrazone in die entsprechenden Aminosäuren nach der Methode von ALFTHAN und VIRTANEN (71) erwies sich als gut geeignet; sie erfolgte in alkoholischer Lösung nach Zugabe von metallischem Zinn durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoffgas. Die Reinigung der hierbei gebildeten Aminosäurelösung auf einer Säule mit Ionenaustauscher MERCK I (stark sauer) ergab ein klares Filtrat, das direkt zur PC verwendet werden konnte.

Die pc Untersuchung des Aminosäuregemisches erfolgte mit den üblichen Fließmitteln. Zur Kenntlichmachung der einzelnen Aminosäuren auf den Chromatogrammen wurde Ninhydrin verwendet (72) und die erhaltenen Flecke konnten mit Kupfer(II)ionen haltbar gemacht werden (73).

Abb. 6 zeigt ein Mischchromatogramm, das diejenigen Aminosäuren enthält, die über die DNP-Hydrazin-Verbindungen der sauren Carbonylverbindungen aus den Untersuchungslösungen 1 und 2 gewonnen wurden. Es konnte nachgewiesen werden: Serin, α -Alanin und Glycin. Das Chromatogramm zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen den hergestellten Aminosäuren und den entsprechenden Vergleichsproben.

Der Nachweis des Serins besagt, daß Hydroxybrenztraubensäure in den Analysenlösungen 1 und 2 vorhanden ist; über

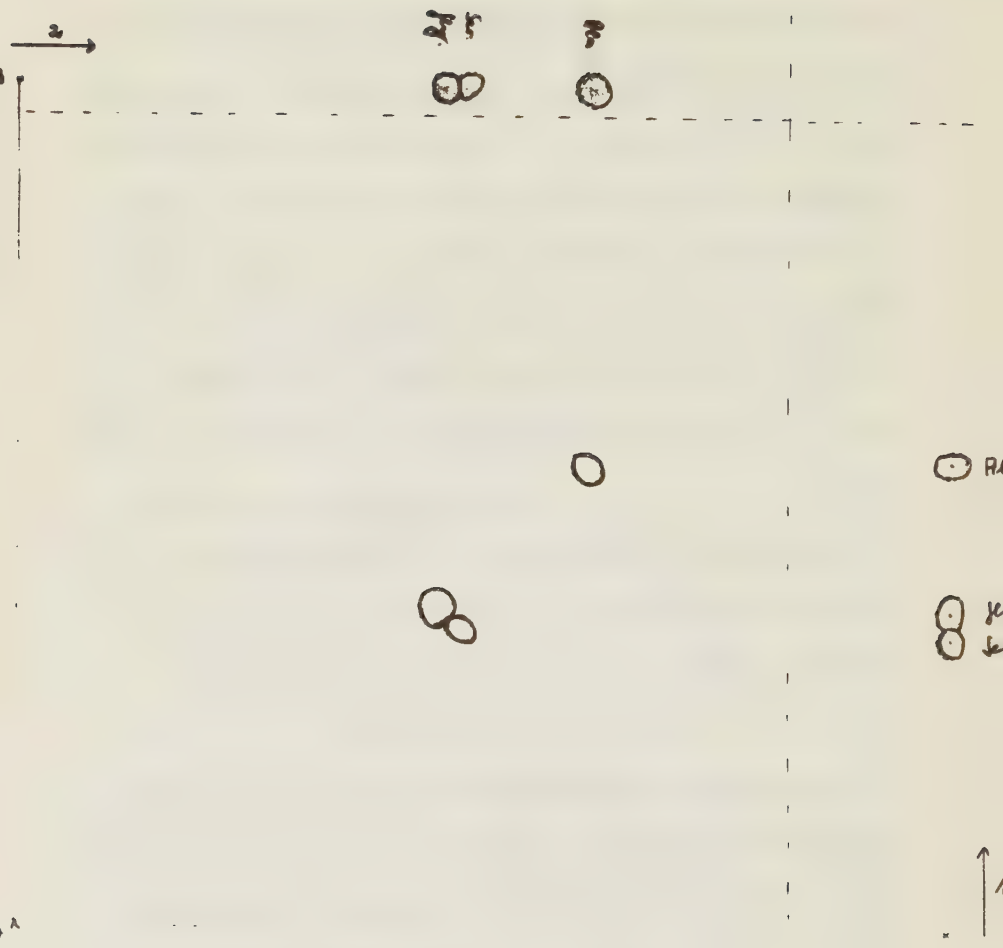


Abb. 6

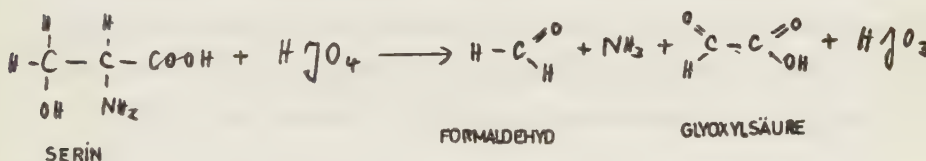
Zweidimensionale PC der aus den DNP-Hydrazin-Ketosäuren
hergestellten Aminosäuren.

- Methodik: aufsteigend
1. Richtung: Phenol-Wasser (80:20)
 2. Richtung: Chloroform-Methanol-17% Ammoniak (40:40:20)
- Punkt A : Startpunkt für die Analyse
- Punkte B: Startpunkte für die Vergleichsproben
- gestrichelte Linien: Fließmittelfronten

die Bedeutung der Anwesenheit von α -Alanin und von Glycin wird in den Kapiteln über Brenztraubensäure und Glyoxylsäure berichtet (s.S.38+41).

Um das Ergebnis noch zu erhärten, wurde das Dinitrophenylderivat des Serins hergestellt, auf dessen Gewinnung in den Kapiteln über Brenztraubensäure und Glyoxylsäure näher eingegangen wird (s.S. 38 und Abb.7).

Der qualitative Nachweis des Serins gelang neben den beschriebenen Verfahren durch Oxydation einer Probe mit Natriummetaperjodat und Identifizierung des gebildeten Formaldehyds mit Chromotropsäure (74).



Die für diesen Nachweis benötigte Vergleichsprobe von Hydroxybrenztraubensäure wurde durch Oxydation von Dihydroxyaceton mit Kupfersulfat gewonnen (75), die anschließend, wie bereits beschrieben, über das DNP-Hydrazon in Serin umgewandelt werden konnte.

Hiermit ist die Anwesenheit von Hydroxybrenztraubensäure als Abbauprodukt der AS unter den vorliegenden Lagerungsbedingungen in den Lösungen 1 und 2 mit Sicherheit nachgewiesen.

Mit dem Nachweis der Hydroxybrenztraubensäure war auch das Problem der Geruchsveränderung in den gelagerten Lösungen gelöst, denn die als Vergleich hergestellte Hydroxybrenztraubensäure wies die vorherrschende Komponente des Geruches der gealterten Lösungen auf.

2.3.2.1.2 Nachweis der Brenztraubensäure

Ein Hinweis auf die Anwesenheit von weiteren Ketosäuren, z.B. Brenztraubensäure in den beiden gealterten Lösungen war schon durch die Voruntersuchungen gegeben. Die verschiedenen durchgeführten Vorproben, die nicht als spezifisch anzusehen sind, waren positiv: so ergab die Reaktion mit DNP-Hydrazin eine Fällung, und die direkte pc Untersuchung dieses Niederschlages mit den bei Hydroxybrenztraubensäure erwähnten Fließmitteln zeigte eine gute Übereinstimmung mit Brenztraubensäure-DNP-Hydrazon. Die Bildung von α -Alanin, das auch p c nachgewiesen wurde, weist schon zwingender auf die Anwesenheit von Brenztraubensäure hin. Das α -Alanin wurde direkt und über sein Dinitrophenylderivat^{*)} nachgewiesen (76):

Auf eine genaue Beschreibung der Methode (Herstellung von DNP-Aminosäuren) und ihrer Schwierigkeiten kann verzichtet werden, da in der Literatur verschiedene Zusammenfassungen hierüber zu finden sind; es soll nur an diejenigen von BISERTE et al (77) und FRAENKEL-CONRAT (78) erinnert werden. Die Herstellung der DNP-Aminosäuren erfolgte in alkalischer Lösung mit DNFB. Das Arbeiten mit diesen Verbindungen ist wegen ihrer kräftigen gelben Eigenfarbe verhältnismäßig einfach. Es gelingt mit verschiedenen Fließ-

*) Es sollen folgende Abkürzungen gelten:

D N F B für Dinitrofluorbenzol

D N P-Aminosäure für 2,4-Dinitrophenylaminosäuren.

mitteln, das Gemisch aufzutrennen. Auf diesem Wege konnten eindeutig DNP-Alanin, DNP-Serin und DNP-Glycin erkannt werden (Abb.7). Der Nachweis von α -Alanin und von DNP- α -Alanin deutet auf die Anwesenheit von Brenztraubensäure in Lsg. 1 und in Lsg. 2 hin.

Die Umbildung der Aminosäuren in die entsprechenden DNP-Verbindungen wurde für ihren sicheren Nachweis für erforderlich gehalten. Es soll aber hervorgehoben werden, daß nach MEISTER und ABENDSCHEIN (79) aus den DNP-Hydrazonen verschiedener Ketosäuren bei deren Aminierung die gleichen Aminosäuren entstehen können:

z.B. aus	Oxalessigsäure	: Asparaginsäure, α -Alanin, β -Alanin
	Hydroxybrenz- traubensäure	: Serin, α -Alanin
	Brenztraubensäure	: α -Alanin
	α -Ketomalonsäure	: α -Aminomalonsäure, Glycin
	Glyoxylsäure	: Glycin

Die Bildung des α -Alanins konnte also auch aus anderen DNP-Hydrazon-Ketosäuren erfolgen. Es wurde daher dasjenige Ketosäure-DNP-Hydrazon, welches mit Brenztraubensäure-DNP-Hydrazon in den pc und dc Vorproben gut übereinstimmte, vorher auf der Dünnschichtplatte angereichert und mit Essigester eluiert. Diese Lösung in Essigester ergab nach der Aminierung α -Alanin.

Um den Nachweis der Brenztraubensäure endgültig zu sichern, wurde versucht, ein weiteres Derivat aus den Ketosäure -

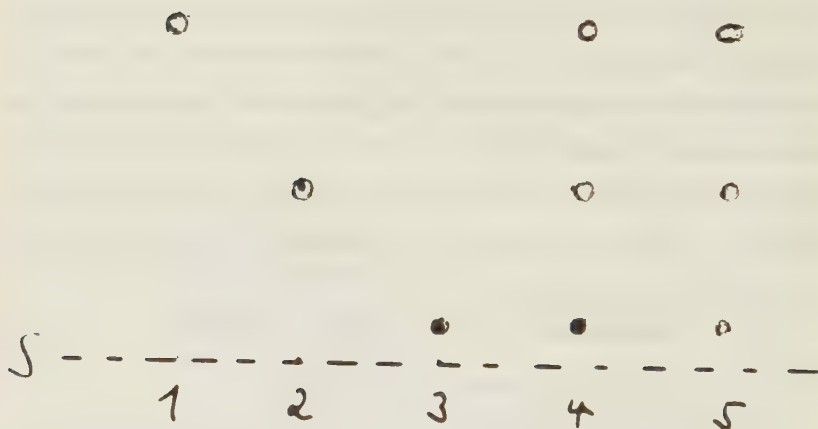


Abb. 7

DC der DNP - Aminosäuren

Kieselgel G MERCK

Fließmittel: Chloroform-Methanol-Essigsäure (95:5:1)

Erklärung: S Startlinie

1 DNP-Alanin

2 DNP-Glycin

3 DNP-Serin

4 Analyse

5 Mischchromatogramm 1-4

DNP-Hydrazonen herzustellen. Hierfür blieben nur noch die Carboxylgruppen, die mit alkalischer Diazomethan-Lösung verestert wurden (60). Bei der dc Untersuchung auf Kieselgel G MERCK erwies sich Benzol mit einem Zusatz von 1% Essigester als günstiges Fließmittel.

In gleicher Weise wurde aus Brenztraubensäure-DNP-Hydrazon die Vergleichssubstanz hergestellt, und die DC ergab eine gute Übereinstimmung zwischen diesen beiden Proben (Abb. 8). Versuche, die Schmelzpunkte der Ester zu bestimmen, scheiterten an den zu geringen, vorliegenden Mengen, trotz der Versuche der Anreicherung über die DC. Die Anwesenheit von Brenztraubensäure in beiden gealterten wässrigen Lösungen der AS kann jedoch auf Grund der oben angeführten Ergebnisse als gesichert angesehen werden. Die Möglichkeit der Anwesenheit einer anderen Ketosäure, die bei der Aminierung auch α -Alanin bildet, war nicht gegeben, wie die pc Voruntersuchungen aussagen.

2.3.2.1.3 Nachweis der Glyoxylsäure

Bei der Beschreibung der Nachweise der Hydroxybrenztraubensäure und der Brenztraubensäure (s.S. 35) mit Hilfe der Aminierung, der die Bildung der DNP-Hydrazin- Verbindungen vorausging, wurde bereits durch pc und dc Voruntersuchungen gezeigt, daß mit der Anwesenheit von Glyoxylsäure in dem Reaktionsgemisch zu rechnen ist.

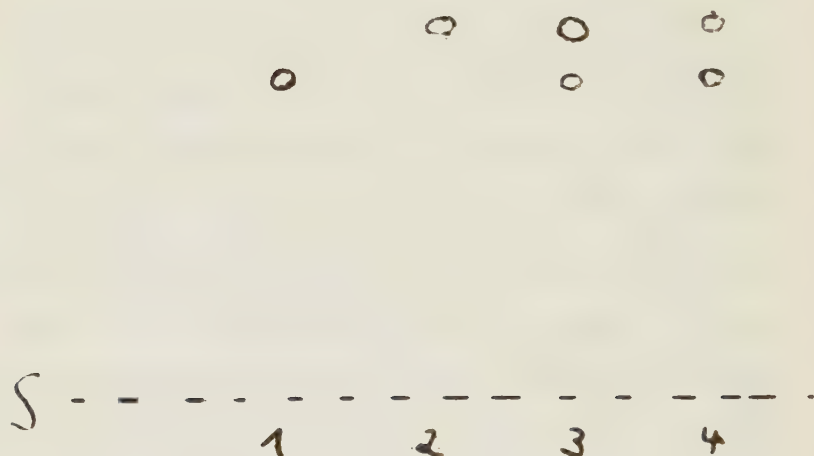


Abb. 8

DC von DNP-Hydrazon-Ketosäuremethylestern

Kieselgel G MERCK

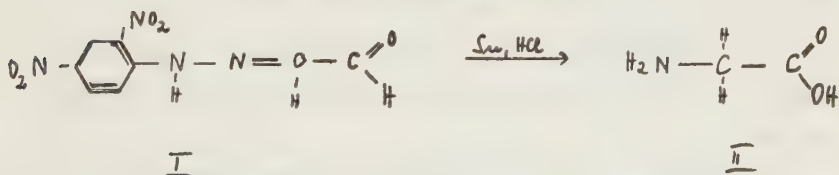
Fließmittel: Benzol mit 1% Essigester

Erklärung : S Startlinie
1 DNP-Hydrazon-Brenztraubensäuremethylester
2 DNP-Hydrazon-Glyoxylsäuremethylester
3 Analyse
4 Mischchromatogramm 1-3

Die angewendeten Farbreaktionen (80,81) sind zu wenig spezifisch, so daß der Nachweis, wie im Falle der Hydroxybrenztraubensäure und der Brenztraubensäure, über das DNP-Hydrazon geführt werden mußte. Aus dieser Verbindung wurden der Methylester (60) sowie die entsprechende Aminosäure (71) hergestellt. Der Methylester der DNP-Hydrazon-Glyoxylsäure wurde dc analysiert und ergab eine gute Übereinstimmung mit der Vergleichsprobe (vgl. Abb. 8, S. 42).

Bei der PC der Aminosäuren konnte Glycin nachgewiesen werden (vgl. Abb. 6, S. 36); sein Nachweis wurde auch hier durch die Bildung des DNP-Glycins erhärtet (vgl. Abb.7, S. 40).

Die Aminierung von Ketosäuren- oder Aldehydsäuren-DNP-Hydrazonen läßt sich nach ALPTHAN und VIRTANEN (71) für den Fall der Bildung von Glycin (II) aus Glyoxylsäure - DNP-Hydrazon (I) folgendermaßen formulieren:



Die Entstehung des Glycins kann auch aus Ketosäure-DNP-Hydrazonen erfolgt sein, z. B. aus α -Ketomalonsäure (79). Diese Möglichkeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, da bei der Untersuchung der verschiedenen sauren DNP-Hydrazin-

Verbindungen nur die Anwesenheit von Hydroxybrenztraubensäure - DNP - Hydrazon, Brenztraubensäure - DNP - Hydrazon und Glyoxylsäure - DNP-Hydrazon wahrscheinlich war.

Das bei der Aminierung der sauren 2,4-Dinitrophenylhydrazone aus beiden Untersuchungslösungen gebildete Glycin beweist damit die Anwesenheit von Glyoxylsäure in Lsg. 1 und in Lsg. 2.

2.3.2.2 Nachweis der neutralen Carbonylverbindungen.

Nach der Abtrennung der sauren Carbonylverbindungen mit Hilfe einer Säule, gefüllt mit stark basischem Ionenaustauscher (MERCK IV), wurden die neutralen Carbonylverbindungen als 2,4-Dinitrophenylhydrazone gefällt. Die Gewinnung des Niederschlages erfolgte durch Filtrieren, Waschen und vorsichtiges Trocknen (bei Zimmertemperatur im Vakuum).

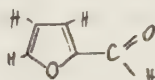
Bei der pc und dc Voruntersuchung des Niederschlages, von dem eine geringe Menge in Äther gelöst worden war, konnte leicht festgestellt werden, daß mehrere neutrale Bestandteile vorlagen. Es mußte daher eine Auftrennung vorgenommen werden.

Die Trennung erfolgte säulenchromatographisch an Aluminiumoxid neutral WOELM : eine Probe der 2,4 Dinitrophenylhydrazone, in möglichst wenig Benzol gelöst, wurde auf die Säule aus Aluminiumoxid aufgetragen und nacheinander in steigender bzw. fallender Konzentration mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: Benzol, Chloroform, Methanol,

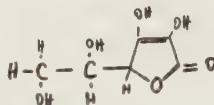
Dioxan. Es ließen sich auf diese Weise mehrere Fraktionen abtrennen. Über ihre Untersuchung und Identifizierung wird im Anschluß berichtet.

2.3.2.2.1 Nachweis des Furfurols

Mit der Möglichkeit der Bildung von Furfurol (I) in den AS-Lösungen war zu rechnen (II=AS).



I



II

Schon früher sind Versuche zum Nachweis dieses Abbauproduktes unternommen worden. HUELIN (82) konnte diese Verbindung in einer AS-Lösung bei Einsatz verschärfter Bedingungen nachweisen: er erhitzte AS-Lösungen auf 100°C und fand Furfurol neben einer Gasentwicklung (Kohlendioxid).

Unter den milden aeroben Bedingungen, wie sie in der Versuchsanordnung dieser Arbeit vorliegen, bildete sich Furfurol auch in der Lösung, die keinen Kupfersalzzusatz erhalten hatte. Die kupferhaltige Lösung war dagegen frei von Furfurol. Trotz mehrfacher Bemühungen gelang es nicht, diese Verbindung in diesen Ansätzen nachzuweisen. Es wird angenommen, daß die C₅-Stufe bei der metallkatalysierten Oxydation sehr schnell durchlaufen wird, so daß eventuell gebildetes

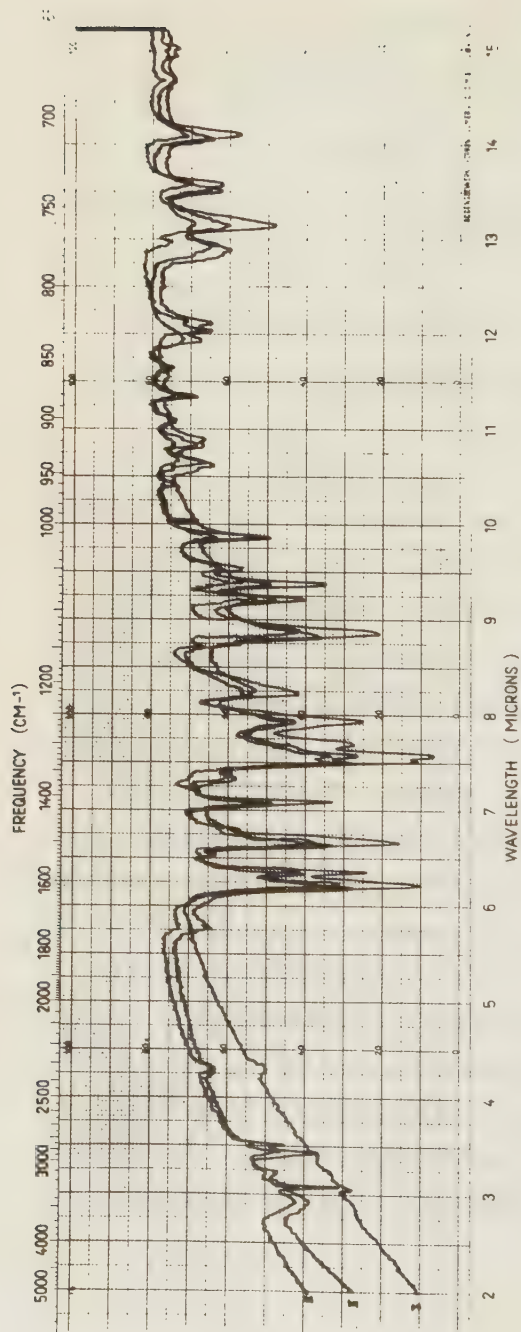


Abb. 9 IR-Vergleichsspektren von isoliertem und authentischem

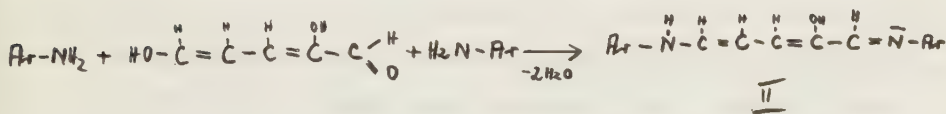
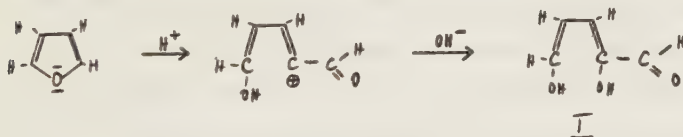
DNP-Hydraxon-Furfurol

- I DNP-Hydraxon-Furfurol, authentisch, rote Modifikation
- II Analyse und 1
- III Analyse

Furfurol nicht mehr faßbar war oder daß eine andere Reaktionsfolge im Abbau stattfindet.

Für den Nachweis des Furfurols mit Hilfe von Farbreaktionen gibt es zahlreiche Möglichkeiten, von denen die Reaktionen mit Xylidin-Eisessig bzw. Anilin-Eisessig nach den Angaben von SCHIFF (83,84) als besonders günstig gefunden wurden; es resultierte in Lsg. 1 eine Rotfärbung; in der gleichen Lösung wurde mit Resorzin oder Pyrogallussäure und wenig Salzsäure eine Blaufärbung gefunden (85).

Bei der Reaktion mit Anilin-Eisessig entsteht nach FEIGL(109) durch Protonisierung aus Furfurol durch Aufspaltung des Moleküls α -Hydroxyglutaconaldehyd(I), der sich mit 2 Molekülen eines primären aromatischen Amins (Anilin) unter Bildung von α -Hydroxyglutaconaldehyddianil(II) umsetzt:



Wenn diese Reaktionen auch nur als Vorproben zu werten sind, so geben sie doch schon einen gewissen Anhaltspunkt für die Anwesenheit von Furfurol.

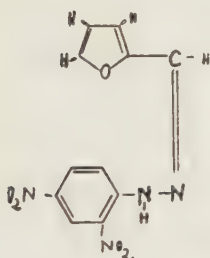
Größere Beweiskraft ist der Bildung des Furfurol-DNP-Hydrazons (Schmelzpunkte: Rote Form 230°C, gelbe Form 212-214°C) und der Aufzeichnung des IR-Spektrums dieser

Verbindung beizumessen (Abb. 9), dessen charakteristische Banden bei 3250 cm^{-1} (NH-Gruppe, durch Wasserstoffbrücken gebunden) und 1408 cm^{-1} (CH-Gruppe, Streckschwingung der cis-Doppelbindung) liegen.

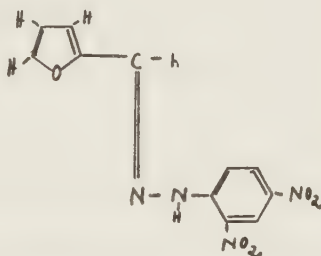
Wie bereits auf den Seiten 32-33 berichtet werden konnte, wurden die sauren und neutralen Carbonylverbindungen mit Hilfe einer stark basischen Ionenaustauschersäule (MERCK IV) voneinander getrennt, so daß sich in den wässrigen Filtraten die neutralen Bestandteile (Aldehyde, Ketone) befanden. Bei der Reaktion dieser Lösung mit DNP-Hydrazin bildete sich ein Niederschlag, der ein Gemisch verschiedener Substanzen war, wie sich bei orientierenden pc und dc Untersuchungen zeigte. Es war daher erforderlich, vor der Identifizierung der Einzelbestandteile eine Auftrennung des Gemisches vorzunehmen. Bei der säulenchromatographischen Untersuchung des Reaktionsgemisches an Aluminiumoxid neutral WOELM mit verschiedenen Fließmitteln wurden mehrere Fraktionen erhalten, über deren Identifizierung anschließend berichtet werden soll. Die einzelnen Verbindungen werden nach dem System von HILL (29), angeordnet nach abnehmender Molekülgröße, behandelt.

Bei der dc Untersuchung der ersten Fraktion an Kieselgel G MERCK (Fließmittel Benzol) traten, wie auch bei der als Vergleich dienenden Probe von authentischem Furfurol-DNP-Hydrazon, zwei Flecke mit den R_f - Werten von 0,51 und 0,61 auf.

Beim Besprühen mit alkoholischer Kalilauge färbten sich die Flecke unterschiedlich an: der Fleck mit dem Rf-Wert 0,51 färbte sich braun, derjenige mit dem Rf-Wert 0,61 rotbraun (86). Die Erklärung hierfür gibt die Beobachtung von BREDERECK(87), der zwei verschiedene Formen von Furfurol-DNP-Hydrazonen beschreibt. BUSCH (88) erklärt die Existenz dieser beiden Modifikationen von Furfurol-DNP-Hydrazonen mit einer Cis-trans-Isomerie:



CIS-FORM (GELB)



TRANS-FORM (ROT)

Zum Vergleich wurden die beiden Formen von Furfurol-DNP-Hydrazonen aus authentischem Furfurol hergestellt (87): sie zeigten gleiches Verhalten.

Die rote Form, die die stabilere ist, bildete in der Analysenprobe die Hauptmenge und war auch in der synthetisierten gelben Form immer noch anwesend. Die beiden hergestellten Verbindungen unterschieden sich in ihren Schmelzpunkten:

	Rote Form	Gelbe Form
Analyse:	228°C	209°C
Vergleichssubstanz:	230°C	212-214°C



Abb. 10 DC von isoliertem und authentischem
Furfurol-DNP-Hydrazon.

Kieselgel G MERCK

Fließmittel : Benzol

Erklärung S : Startlinie

1 : Analyse

2 : Authentische Probe (rote Modifikation)

3 : Authentische Probe (gelbe und rote
Modifikation)

4 : Mischchromatogramm 1-3

Die Gewinnung der gelben Form aus der Analysenlösung (Lsg. 1) bereitete einige Schwierigkeiten, da ihre Reinigung nur über die DC erfolgen konnte. Die Menge des zur Verfügung stehenden Stoffes war jedoch äußerst gering; weitere Umkristallisationen konnten daher nicht vorgenommen werden.

Als Beweis diente eine Mischchromatogramm (Abb. 10), auf dem in 4 verschiedenen Startpunkten folgende Substanzen aufgetragen wurden: Analyse aus Lsg. 1, Vergleichsprobe (rote Modifikation), Vergleichsprobe (gelb und rote Modifikation) und ein Gemisch aus der Analyse und den Vergleichsproben. Die Abb. 10 zeigt eine gute Übereinstimmung der einzelnen Bestandteile.

Die Anwesenheit von Furfurol in Lsg. 1 konnte weiterhin durch die Bildung der Acetylderivate (88) bewiesen werden: die Schmelzpunkte der Acetylderivate aus dem Gemisch der beiden Formen von Furfurol-DNP-Hydrazonen und aus den einzelnen Modifikationen waren mit $171 - 172^{\circ}\text{C}$ identisch.

Die Gegenwart von Furfurol in Lsg. 1 konnte damit als erwiesen angesehen werden; in Lsg. 2 war Furfurol nicht nachweisbar. Es soll an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden, daß Brenzschleimsäure, die aus Furfurol durch Oxydation gebildet werden kann, in beiden Ansätzen nicht beobachtet werden konnte.

2.3.2.2.2 Nachweis des Glyzerinaldehyds.

Da bei der Auftrennung der neutralen Carbonylverbindungen mehrere Fraktionen erhalten wurden, war damit zu rechnen, daß sich auch Aldehyde oder Ketone mit geringerer Kettenlänge gebildet hatten. Die vergleichenden pc und dc Untersuchungen der einzelnen 2,4-Dinitrophenylhydrazone ergaben erste Hinweise auf die Anwesenheit von Glyzerinaldehyd.

Am besten geeignet war die DC auf Kieselgel G MERCK mit dem Fließmittel Toluol-Essigester (86:4); mit dem gleichen Fließmittel wurde auch dc auf Aluminiumoxid basisch WOELM gearbeitet: hier ergaben die Proben aus den Lösungen 1 und 2 bzw. diejenigen von authentischem Glyzerinaldehyd - DNP-Hydrazon denselben Rf-Wert (0,09), während die gleichen Verbindungen, auf Kieselgel G MERCK getrennt, den Rf-Wert 0,34 aufwiesen.

Beim Besprühen mit alkoholischer n KOH färbten sich die Flecke einheitlich braunrot. Versuche, diese Verbindung mit Hilfe der präparativen DC anzureichern, scheiterten, da auch bei größeren Ansätzen die Ausbeute zu gering blieb, um zu einem kristallisierten Produkt zu führen. Die JR-Spektroskopielieferte hier den Beweis für die Anwesenheit von Glyzerinaldehyd (Abb. 11): die JR-Spektren der Glyzerinaldehyd-DNP-Hydrazon-Proben aus den Untersuchungslösungen 1 und 2 (als Gemisch) zeigen eine gute Übereinstimmung mit demjenigen von authentischem Glyzerinaldehyd -

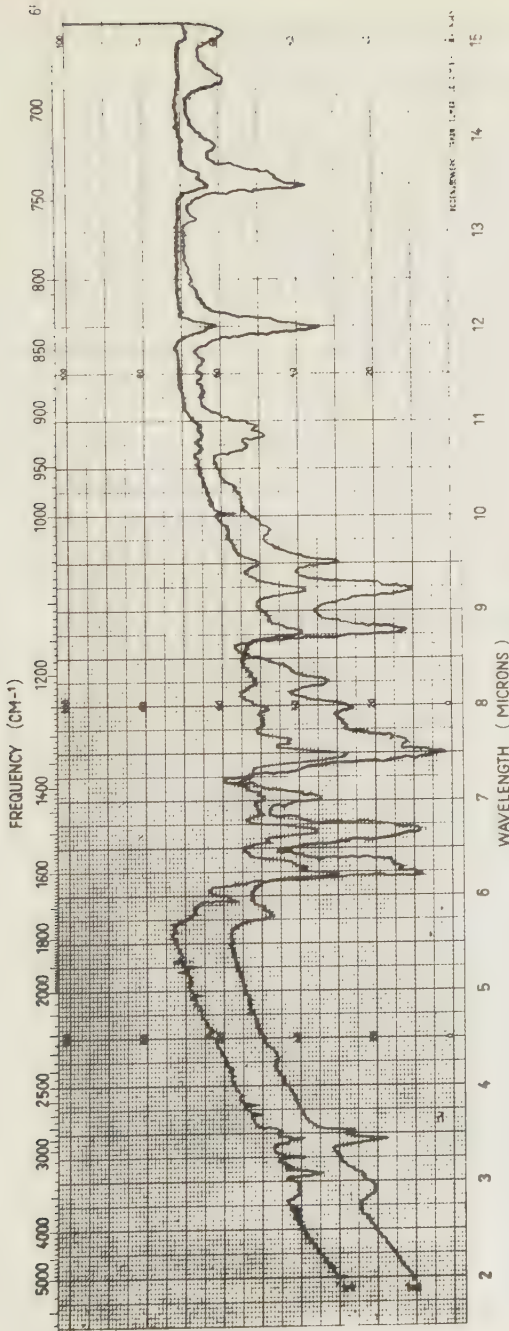


Abb. 11 IR-Vergleichsspektren von isoliertem und authentischem

D,L - Glycerinaldehyd - DNP-Hydrason

I Vergleich

II Analyse

DNP-Hydrazon. Die Abb. 11 zeigt folgende für Glycerinaldehyd-DNP-Hydrazon charakteristische Banden:

3450 cm^{-1} : Hydroxyl-Gruppe, durch Wasserstoffbrücken gebunden

3220 cm^{-1} : NH-Gruppe , durch Wasserstoffbrücken gebunden

3050 cm^{-1} : Valenzschwingung der aromatischen CH-Gruppe

2990 cm^{-1} : Valenzschwingung der aliphatischen CH-Gruppe

Der Glycerinaldehyd war somit in beiden Ansätzen nachgewiesen worden.

Die zahlreichen anderen Nachweismöglichkeiten, die man für Glycerinaldehyd in der Literatur findet (89), konnten wegen ihrer geringen Spezifität (Farbreaktionen) nur als Hinweise für die Anwesenheit von Glycerinaldehyd in den beiden Untersuchungslösungen gewertet werden.

2.3.2.2.3 Nachweis des Glykolaldehyds.

Die Anwesenheit von Glykolsäure macht auch die Gegenwart von Glykolaldehyd möglich. Bei der näheren Untersuchung dieser Verbindung stellte sich heraus, daß sie nur in sehr geringen Mengen in den beiden Ansätzen vorkommt. Daher bereitete ihr Nachweis größere Schwierigkeiten. Die zahlreichen eingesetzten Nachweisverfahren (90) scheiterten, da bei der Darstellung von Derivaten die anderen Bestandteile der Lösungen störend wirkten. Die Herstellung, Abtrennung

und Isolierung des Glykolaldehyd- DNP-Hydrazons geschah nach den bereits mehrfach beschriebenen Methoden; Versuche, aus diesem Derivat den Glykolaldehyd zurückzugewinnen, scheiterten an den zu geringen Mengen, die an Glykolaldehyd- DNP-Hydrazon zur Verfügung standen. Die Untersuchung dieser Verbindung erfolgte dc mit verschiedenen Fließmitteln auf Kieselgel G MERCK und auf Aluminiumoxid basisch WOELM für die DC; als Vergleichssubstanz diente das DNP-Hydrazon von authentischem Glykolaldehyd. Die DC ergab eine gute Übereinstimmung zwischen den aus den beiden Untersuchungslösungen isolierten Glykolaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazonen und dem Glykolaldehyd - DNP-Hydrazon, welches als Vergleich diente.

Da dieses Ergebnis jedoch noch nicht ausreichte, wurden die beiden Glykolaldehyd-DNP-Hydrazone aus der Lsg. 1 und der Lsg. 2 auf der Dünnschichtplatte angereichert, gereinigt und mit Äther extrahiert. Die IR-Spektren des Gemisches und dasjenige der Vergleichssubstanz stimmen gut überein und zeigen folgende charakteristische Banden (Abb. 12):

- 3440 cm^{-1} : Hydroxyl-Gruppe, durch Wasserstoffbrücken gebunden,
- 3260 cm^{-1} : NH-Gruppe, durch Wasserstoffbrücken gebunden,
- 3070 cm^{-1} : Valenzschwingung der aromatischen CH-Gruppe,
- 2920 cm^{-1} : Valenzschwingung der aliphatischen CH-Gruppe.

Der Beweis für die Anwesenheit von Glykolaldehyd in den beiden Untersuchungslösungen konnte, trotz der nur geringen vorliegenden Mengen, somit erbracht werden.

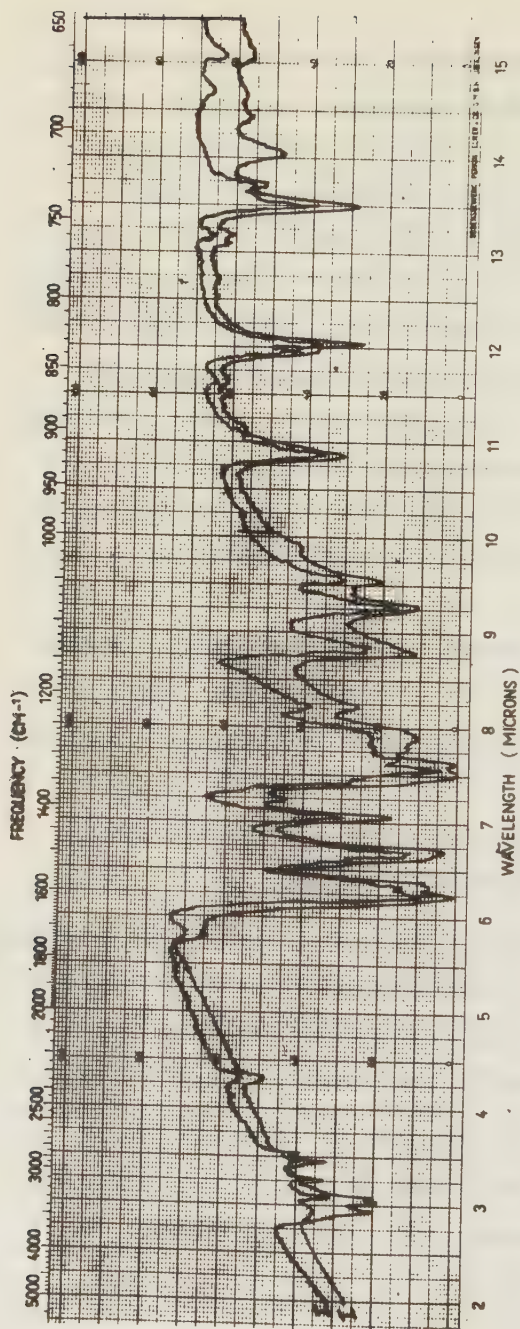


Abb. 12 JR-Vergleichsspektren von isoliertem und authentischem
Glykolaldehyd - DNP-Hydrazone

- I. Vergleich
- II. Analyse

2.3.2.2.4 Nachweis des Glyoxals

Nach der Identifizierung von Furfurol, Glyzerinaldehyd und Glykolaldehyd blieb noch eine Verbindung übrig, deren Konstitution zu klären war. Der Nachweis erfolgte auch über das DNP-Hydrazone, das ebenfalls aus dem Gemisch der neutralen Carbonyl-DNP-Hydrazone mit Hilfe einer Säule von Aluminiumoxid neutral WOELM isoliert werden konnte. Die Analyse durch die PC und DC bereitete hier keine Schwierigkeiten. In der PC wurde das Verfahren von SCHMITT u.a. (91) angewandt: diese Methode arbeitet aufsteigend mit dem Fließmittel Dibutyläther- Dimethylformamid-Tetrahydrofuran (85 : 15 : 4). Es ergab sich für Glyoxal-DNP-Hydrazone ein Rf-Wert von 0,3, der mit demjenigen der isolierten Verbindung übereinstimmte. Die DC erfolgte mit dem Fließmittel Benzol auf Kieselgel G MERCK.

Die Identifizierung mit Hilfe des Schmelzpunktes des Glyoxal-DNP-Hydrazons aus den Lösungen 1 und 2, das durch präparative DC angereichert und gereinigt wurde, gelang nicht. Trotz mehrfachen Umkristallisierens aus Nitrobenzol konnte der Schmelzpunkt, der sich in der Literatur für Glyoxal-DNP-Hydrazone findet, nicht erreicht werden. Die Substanz begann bei 310°C zu schmelzen und sublimierte ab 315°C. In der Literatur werden mehrere unterschiedliche Angaben über den Schmelzpunkt von Glyoxal-DNPH gemacht: der niedrigste Wert wird mit 318°C (92) angegeben.

Da durch die Bestimmung des Schmelzpunktes von Glyoxal-DNP-Hydrazone die Identifizierung des Glyoxals nicht möglich

war, wurden die IR-Spektren der Analyse und der authentischen Blindsubstanz aufgenommen. Beide Absorptionskurven zeigen eine gute Übereinstimmung (Abb. 13) und folgende charakteristische Banden:

3250 cm^{-1} : NH-Gruppe, durch Wasserstoffbrücken gebunden,
3080 cm^{-1} : Valenzschwingung der aromatischen CH-Gruppe,
2910 cm^{-1} : Valenzschwingung der aliphatischen CH-Gruppe.

Darüber hinaus gelang der Nachweis des Glyoxals nach der Spaltung der DNPH-Hydrazin-Verbindung (93-95): das Glyoxal-DNP-Hydrazon wurde nach CASNATI und CAVALLERI (93) in Chloroform gelöst, und die siedende Lösung wurde mit Zinn(II)-chlorid in HCl-Gas-gesättigtem Äther versetzt. Nach Entfernung der Lösungsmittel durch längeres Kochen im Vakuum und Extraktion des Aldehyds mit Äther gelang der Identitätsnachweis des Glyoxals durch die Reaktion mit 1,3-Dihydroxynaphthalin (96).

Nach der Aussage der IR-Spektren und der Färbung mit 1,3-Dihydroxynaphthalin konnte die Anwesenheit des Glyoxals in beiden Untersuchungslösungen als erwiesen betrachtet werden.

2.4 Prüfung auf weitere Stoffe in den beiden Untersuchungslösungen.

Nachdem alle bei den dc und pc Untersuchungen auftretenden Verbindungen aufgeklärt werden konnten, wurde im Laufe der Arbeit versucht, außer den bereits erwähnten Abbauprodukten noch weitere Verbindungen zu identifizieren. Da

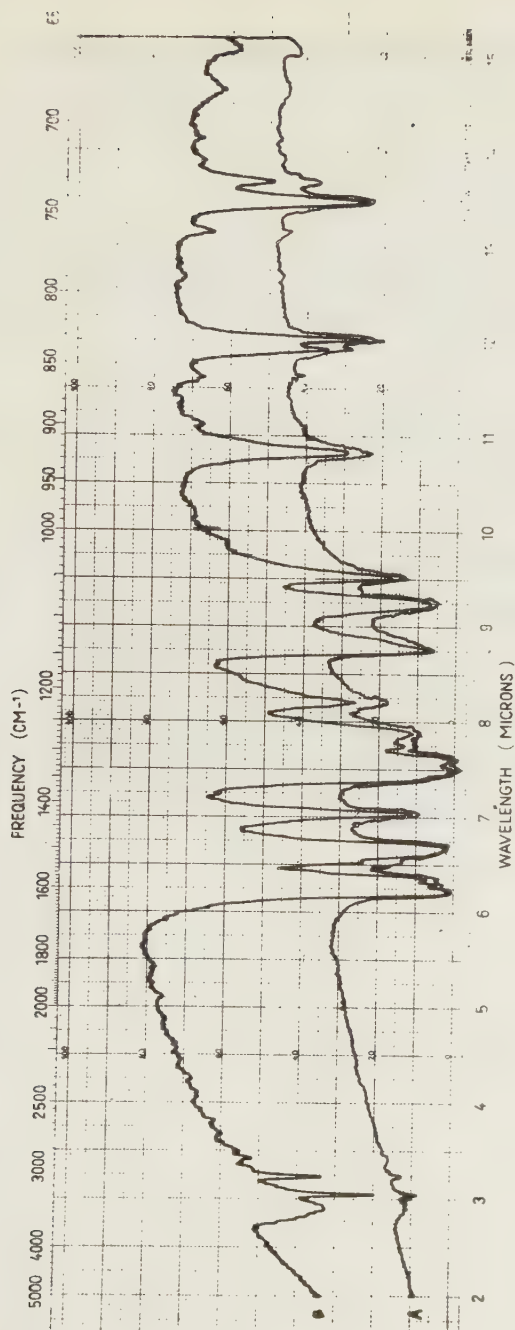


Abb. 13 IR-Vergleichsspektren von isoliertem und authentischem
Glyoxal - DNP - Hydrazon.

A : Vergleich
B : Analyse

diese Untersuchungen aber negativ verliefen, werden die vermuteten Stoffe lediglich erwähnt, und es wird auf eine Beschreibung der angewendeten Analysenmethoden verzichtet. Untersucht wurde auf folgende Verbindungen:

Säuren: L-Lyxonsäure, L-Xylonsäure, Brenzschleimsäure, L-Weinsäure, D,L-Glyzerinsäure, Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure.

Ketosäuren: α -Ketobuttersäure, Laevulinsäure, Oxalessigsäure, Mesoxalsäure.

Neutrale Carbonylverbindungen:

Ketone: Dihydroxyaceton, Monohydroxyaceton, Acetylaceton, Aceton, Methyläthylketon, Diacetyl.

Aldehyde: Glutardialdehyd, Methylglyoxal, Propionaldehyd, Acetaldehyd, Formaldehyd, Crotonaldehyd, Acrylaldehyd.

2.5 Überprüfung von Industriepräparaten.

Nach der Identifizierung der in Kapitel 2.3 beschriebenen Abbauprodukte der AS in wässrigen Lösungen war es von Interesse, zu überprüfen, ob ähnliche Verbindungen sich auch während der Lagerung von AS-haltigen Industriepräparaten gebildet hatten. Es gelang, verschiedene Mischpräparate (Dragees, Tabletten) zu erhalten, deren Alter genau mitgeteilt worden war. Obwohl einige Präparate bis zu 7 Jahre alt waren, konnten keine der in Kapitel 2.3 erwähnten Abbauprodukte der AS festgestellt werden. Diese Beobachtung zeigt, daß die untersuchten Dragees und Tabletten unter Berücksichtigung der zur Stabilisierung erforderlichen Maßnahmen hergestellt worden waren.

Es wurden auch *r e i n e* Vitamin C-Präparate zur Verfügung gestellt, und zwar "Cebion"-Tabletten, MERCK Darmstadt, sowie "Redoxon"-Tabletten, DEUTSCHE HOFFMANN- LA ROCHE AG. Diese Tabletten wiesen trotz 22-jähriger Lagerzeit keine der in dieser Arbeit gefundenen Abbauprodukte auf, und eine quantitative AS-Bestimmung nach ROE und KUETHER (34) ergab einen der deklarierten Menge an AS entsprechenden Wert. Auch dieser Befund ist ein Beweis dafür, daß die Verarbeitung schon damals nach modernen Gesichtspunkten erfolgte.

2.6 Zeitliche Entstehung der einzelnen Abbauprodukte bei verschiedenen p_H -Werten.

Nach der Identifizierung der in Lsg. 1 und in Lsg. 2 entstandenen Abbauprodukte interessierten die Reihenfolge und der Zeitpunkt der Entstehung der einzelnen Verbindungen, vom Tage der Bereitung der Untersuchungslösungen an gerechnet. Gleichzeitig wurde auch das Verhalten wässriger AS-Lösungen bei 2 verschiedenen p_H -Werten untersucht, um festzustellen, ob der Abbau in ähnlicher Weise verläuft wie in den beschriebenen Lösungen. Hierzu dienten 2 wässrige Proben ohne Kupfersulfatzusatz, die auf p_H 7,0 (Phosphatpuffer, Lsg. 3) bzw. auf p_H 9,0 (Natronlauge - Glykokolenatriumchloridpuffer, Lsg. 4) (110) eingestellt worden waren.

Für die Untersuchung dieser 4 Lösungen wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Analysenmethoden angewandt. Die einzelnen Verbindungen entstanden in nachstehender Reihenfolge (Tabelle 1):

Tabelle 1: Zeitliche Entstehung der einzelnen Abbauprodukte.

Verbindungen aus:							
Dauer des Versuches in Tagen							
Lsg. 1 ohne Cu ²⁺		Lsg. 2 mit Cu ²⁺		Lsg. 3 ohne Cu ²⁺		Lsg. 4 ohne Cu ²⁺	
1	DHA, DKS	1	DHA, DKS	1	DHA, DKS	1	DHA, DKS
10	Furfurol		Kohlendioxid		L-Threon- säure		L-Threon- säure
16	L-Threonsäure		L-Threonsäure	10	Glyoxal	5	Glyoxal
34	Hydroxybrenz- traubensäure	10	Hydroxybrenz- traubensäure	14	Oxalsäure	6	Oxalsäure
47	Brenztrauben- säure	20	Brenztrauben- säure				
54	Glyzerin- aldehyd	23	Glyzerin- aldehyd				
58	Glykolsäure	27	Oxalsäure				
65	Glykolaldehyd, Glyoxylsäure	29	Glyoxal, Glykolaldehyd				
68	Glyoxal, Oxalsäure	31	Glykolsäure				
		34	Glyoxylsäure				

Man sieht, daß die Oxydationen in den beiden Untersuchungs-
lösungen 1 und 2 in ähnlicher Weise verlaufen. Es ergaben sich
bei den C₂-Verbindungen Unterschiede. Furfurol konnte auch hier
in Lsg. 2 nicht festgestellt werden. Ein Vergleich der Gesamt-
zeiten zeigt den katalytischen Einfluß der Kupfer -(II)-ionen.

Die Bildung der einzelnen Umwandlungsprodukte wurde wesentlich beschleunigt; sie dauerte nur etwa die halbe Zeit.

In den Lösungen 3 und 4 waren Furfurol, die C_3 -Verbindungen und einige der C_2 -Verbindungen nicht nachweisbar. Es kann angenommen werden, daß diese Körper zwar intermediär entstehen, jedoch infolge des ca. 5 mal schnelleren Abbaus nicht erfaßt wurden. Dieser Befund stimmt mit früheren Ergebnissen überein, nach denen AS in alkalischen Lösungen schnell umgewandelt wird. Aus diesem Grunde werden auch zur Extraktion von AS aus pflanzlichem und tierischem Material Salzsäure-Oxalsäure, Trichloressigsäure oder Metaphosphorsäure verwendet.

2.7. Verfolgung des Abbaus radioaktiv markierter L-Askorbinsäure.

Um einen Einblick in den Ablauf der Veränderungen der AS in wässrigen Lösungen zu erhalten, wurden Versuche durchgeführt, bei denen radioaktive AS ($^{14}\text{C}_1$) zu nicht markierter AS im Verhältnis 1:714 gegeben worden war, entsprechend maximal 25 μC auf 500 mg unmarkierter AS je Versuchsansatz. Da der Abbau der AS durch intensives Belüften der Probelösungen wesentlich schneller erfolgt^{*)} als bei ruhigem Stehen, wurden die Untersuchungslösungen, die einen Zusatz an radioaktiver AS ($^{14}\text{C}_1$) erhalten hatten, ebenfalls nach dem Belüftungsverfahren behandelt.

Die Ergebnisse der Untersuchung der belüfteten AS-Lösungen mit und ohne Zusatz an radioaktiver AS ($^{14}\text{C}_1$) stimmen überein. Es wird deshalb in Tabelle 2 nur die Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffs aus AS ($^{14}\text{C}_1$) auf die einzelnen Abbauprodukte und deren zeitliche Entstehung angegeben.

Der Nachweis der einzelnen Verbindungen aus den Lösungen 5 (mit AS- $^{14}\text{C}_1$, ohne Cu^{2+}) und 6 (mit AS- $^{14}\text{C}_1$ und Cu^{2+}) geschah nach den in Kapitel 2.3 beschriebenen Methoden.

*) Es konnte in Vorversuchen festgestellt werden, daß bei dem schnelleren Abbau der AS in belüfteten, wässrigen Lösungen dieselben Umwandlungs- und Abbauprodukte entstehen.

Tabelle 2 Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffs aus AS- ^{14}C , auf die einzelnen Abbauprodukte^{*)}.

Dauer des Versuches in Tagen					
Lsg. 5 (ohne Cu^{2+})			Lsg. 6 (mit Cu^{2+})		
2	L-Threonsäure	+	1	Kohlendioxid	+
3	Furfurol	+		L-Threonsäure	+
8	Hydroxybrenz- traubensäure	-	2	Oxalsäure	+
9	Brenztraubensäure	-		Glykolsäure	+
	Glyzerinaldehyd	-	3	Hydroxybrenz- traubensäure	-
12	Glyoxylsäure	+	5	Brenztraubensäure	-
	Glykolaldehyd	+	6	Glyoxylsäure	+
				Glyzerinaldehyd	-
14	Glykolsäure	+	9	Glykolaldehyd	+
17	Glyoxal	+	10	Glyoxal	+
	Oxalsäure	+			

In diesen Versuchen konnten, wie bereits erwähnt, die zeitlichen Ergebnisse, die mit den Lösungen 1 und 2 erhalten wurden, bestätigt werden.

Die Tabelle zeigt weiterhin, daß die Abbauprodukte der beiden Lösungen 5 und 6 die gleiche Markierung aufweisen:

*) Ein (+) -Zeichen bedeutet: diese Verbindung enthält ^{14}C ,
ein (-) -Zeichen bedeutet: diese Verbindung ist nicht radioaktiv.

die C_2 -Verbindungen sind radioaktiv,
die C_3 -Verbindungen sind nicht radioaktiv,
die Threonsäure (C_4 -Verbindung) und
das Furfurol (C_5 -Verbindung, Lsg. 5) sind radioaktiv,
das Kohlendioxid (Lsg. 6) wurde sowohl markiert als auch
nicht markiert gefunden.

Diese Ergebnisse lassen einige Rückschlüsse auf den Verlauf des Abbaus zu. Hierüber wird in der folgenden Diskussion berichtet.

Es soll besonders hervorgehoben werden, daß sich die Ergebnisse durch das Vorkommen von Furfurol in Lsg. 5 und von Kohlendioxid in Lsg. 6 unterscheiden. Das Furfurol kommt demnach als Ursache für die Dunkelfärbung und Geruchsveränderung der Lsg. 6 nicht in Frage. Es muß bei diesen Veränderungen auch in Lsg. 5 an eine Beteiligung der Hydroxybrenztraubensäure und der Brenztraubensäure sowie der anderen Carbonylverbindungen gedacht werden.

2.8 Diskussion.

Die Frage, die nach den in Kapitel 2.7 beschriebenen Ergebnissen im Mittelpunkt der Diskussion stehen soll, ist diejenige nach dem Bildungsweg der einzelnen Verbindungen in den Untersuchungslösungen 5 und 6.

Der Abbau der AS scheint nach diesen Resultaten sehr verwickelt zu verlaufen. Das Fehlen von Kohlendioxid unter den Reaktionsprodukten der Lsg. 5 erschwert die Interpretation. Man kann mit Sicherheit annehmen, daß in beiden Fällen der Abbau über die DHA und die DKS verläuft.

Schon die Erklärung der Bildung der L-Threonsäure macht Schwierigkeiten. Sie kann aus der oberen Hälfte des AS-Moleküls (C_1 - C_4) entstanden sein, da sie markiert ist. Ohne die Annahme eines nicht markierten C_2 -Bruchstückes läßt sich hier schwer eine Deutung finden. Es muß zu Reaktionen der Zwischenprodukte untereinander gekommen sein. Diese Vermutung wird noch gestützt durch die Beobachtung, daß eine längere Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrte L-Threonsäurelösung sämtliche in den gealterten AS-Lösungen gefundenen C_3 - und C_2 -Verbindungen enthielt. Die Bildung von Furfurol ist in gleicher Weise unklar. Für die Festlegung bestimmter Abbauewege reichen die Ergebnisse dieser Arbeit noch nicht aus. Hierzu sind quantitative Bestimmungen der verschiedenen Abbauprodukte und Messungen der Aktivitäten erforderlich, die über den Rahmen der gestellten Aufgabe hinausgegangen wären.

Beim Abbau der Lsg. 6 mit Zusatz von Cu^{2+} wurde Kohlendioxid gefunden, dagegen fehlte Furfurol. Da das Kohlendioxid z.T. markiert, bei länger andauernder Reaktion aber nicht mehr markiert war, ist ein anderer Abbau, bedingt durch die katalytische Wirkung der Kupfer(II)-ionen, anzunehmen.

Es ist durchaus möglich, daß in beiden Fällen der Abbau über ein Peroxyd als Primärprodukt verläuft, obwohl in den beschriebenen Versuchen keine Peroxyde nachgewiesen werden konnten. LEVANDOSKI u.a. (111) beschreiben in einer kurzen Mitteilung die Entstehung eines Peroxydes aus AS, allerdings ohne eingehendere Angaben zu machen. An eine intermediäre Bildung von Persäuren, wie sie LOURY (112) bei der Autoxydation von Fetten beschreibt, ist auch zu denken.

3.	<u>Versuchsteil</u>	70
3.1	Darstellung der beiden Formen des Furfurol- 2,4-dinitrophenylhydrazons	70
3.1.1	Rote Form	70
3.1.2	Gelbe Form	70
3.1.3	Darstellung der Acetylderivate der beiden Formen von Furfurol-DNP-Hydrazonen	71
3.2	Darstellung der L-Threonsäure	71
3.3	PC der L-Threonsäure	73
3.4	Überführung der Ketosäure-DNP-Hydrazone in Aminosäuren	74
3.5	Darstellung der Hydroxybrenztraubensäure	75
3.6	Herstellung der DNP-Hydrazon-Ketosäuremethylester	75
3.7	Herstellung des Glykolsäure-4-phenylphenazylesters	76
3.8	DC des Glykolaldehyd-DNP-Hydrazons	76
3.9	Untersuchung des Niederschlages aus Lösung 2	77
3.9.1	Kupferbestimmung	77
3.9.2	Oxalatbestimmung	77
3.10	PC des Glyoxal-DNP-Hydrazons	78
3.11	Bestimmung des Kohlendioxids	78
3.12	Darstellung der L-Dehydroaskorbinsäure	78
3.13	Darstellung der L-Lyxonsäure und der L-Xylonsäure	79
3.14	Darstellung der α -Ketobuttersäure	81
3.15	Aufnahme der IR-Spektren	82
3.16	Messung der radioaktiven Abbauprodukte	83

3. Versuchsteil

3.1 Darstellung der beiden Formen des Furfurol- 2,4-Dinitrophenylhydrazons (37)

3.1.1 Rote Form: Eine Lösung von 1,2 g DNP-Hydrazin und 1,2 ml Furfurol (frisch destilliert) in 100 ml heißem Äthanol wurde kurz aufgekocht und nach Zusatz einiger Tropfen konz. Salzsäure weiter erwärmt. Es schied sich ein dicker rotgelber Kristallbrei ab, der bald in eine tiefrote kristalline Substanz übergang. Ausbeute 1,2 g, Schmelzpunkt 230°C nach zweimaligem Umkristallisieren aus Pyridin.

3.1.2 Gelbe Form: 1 g DNP-Hydrazin wurde in 100 ml absolutem Äthanol heiß gelöst und 20 ml absoluter Äthanol zugegeben, der 1,5% Chlorwasserstoffgas und 0,5 ml Furfurol (frisch destilliert) enthielt. Beim Erkalten schied sich die Hauptmenge des gelben Furfurol-DNP-Hydrazons aus, nur wenig mit der roten Form verunreinigt. Sie wurde aus Pyridin umkristallisiert und zur weiteren Reinigung in der Wärme in Aceton gelöst und mit dem gleichen Volumen an kaltem absolutem Alkohol versetzt. Beim Erkalten schied sich die gelbe Form dann in schönen langen, gelborange gefärbten Kristallen aus. Ausbeute 0,3 g, Schmelzpunkt $212^{\circ} - 214^{\circ}\text{C}$.

3.1.3 Darstellung der Acetylderivate der beiden Formen von Furfurol-2,4-dinitrophenylhydrazonen.(88)

Nach BUSCH (88) beruht die unterschiedliche Farbe der beiden DNP-Hydrazone des Furfurols auf einer cis-trans-Isomerie. Die Acetylierung beider Verbindungen liefert jedoch nur eine Substanz. Das Gemisch von je 0,6 g der gelben und der roten Form wurde mit 6 ml Essigsäureanhydrid und 8,5 ml Pyridin zwei Stunden lang gekocht und in 200 ml Wasser eingerührt; der aus 30 ml Äthanol umgelöste Niederschlag zeigte nach weiterem, zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol unter Zusatz von Tierkohle einen Schmelzpunkt von 171° - 172° C; Ausbeute 0,08 g.

Der Mischschmelzpunkt der beiden getrennt hergestellten Acetylderivate lag ebenfalls bei 171° C.

3.2 Darstellung der L-Threonsäure.

Die Gewinnung dieser Verbindung verlief über mehrere Stufen. Zunächst erfolgte die Bildung der Aceton-L-Ascorbinsäure nach dem Verfahren von v. VARGHA (46): 20 g AS wurden mit 500 ml Aceton in Gegenwart von 50 g wasserfreiem Kupfer(II)-sulfat 24 Std. lang geschüttelt. Die filtrierte Lösung wurde im Vakuum auf ein Drittel des Anfangsvolumen eingeeengt. Nach Zusatz der doppelten Menge an Petroläther kristallisierte das Monoacetonderivat der AS in langen farblosen Prismen aus. Diese wurden nochmals in Aceton gelöst und durch Zugabe von Petroläther gefällt. Ausbeute ca. 70%.-

Es folgt die Oxydation der L-Aceton-Ascorbinsäure zur L-Aceton-Threonsäure. Nach REICHSTEIN (97) wurden 4,32 g Aceton-L-Ascorbinsäure (0,02 M) in 100 ml mit Kohlendioxid gesättigtem Wasser suspendiert, mit einer Kältemischung bis zur beginnenden Eisbildung abgekühlt und unter lebhaftem Schütteln allmählich mit einer Lösung von 4,2 g Kaliumpermanganat und 3,5 g Pottasche in 120 ml dest. Wasser versetzt. Hierbei sollte die Temperatur möglichst 0°C nicht überschreiten. Nach Entfärbung der Lösung flockte das Mangandioxid durch Erwärmen auf 50°C aus. Es wurde abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und das klare Filtrat im Vakuum bei 40°C bis zur Trockne eingedampft. Die durch mehrmaliges Auskochen des Rückstandes mit absolutem Alkohol erhaltene klare Lösung ergab nach dem Einengen im Vakuum und nach dem Zusatz von etwas Aceton die erste Kristallisation des Kaliumsalzes der Aceton-L-Threonsäure, das nach längerem Stehen abgesaugt und mit Aceton/Alkohol (1:1) gewaschen wurde. Durch Einengen der Mutterlauge zum Sirup, Überschichten mit Aceton und Zugabe von wenig absolutem Alkohol konnte eine weitere Ausbeute erzielt werden. Die Gesamtmenge an Kaliumsalz der Aceton-L-Threonsäure betrug 2,5 g, entsprechend 60% der theoretischen Ausbeute.-

Dieses Salz ist leicht löslich in Wasser, beträchtlich schwerer in Alkohol, schwer in Aceton und unlöslich in Äther. Es kann aus absolutem Alkohol unter Zusatz von etwas Aceton nach dem Einengen umkristallisiert werden. Es hat einen Schmelzpunkt von 154-157°C.

Nach FELDHEIM und CZERNY (98) war es möglich, aus dem umkristallisierten Salz durch Behandlung mit Ionenaustauschern und Hydrolyse die L-Threonsäure frei zu machen. Da für unsere Zwecke eine Lösung der Säure ausreichend war, wurden 4 g des Salzes in wenig Wasser gelöst und durch eine Säule geschickt, die mit stark saurem Ionenaustauscher (MERCK I) gefüllt war. Anschließend wurde unter Zugabe von einigen Tropfen 25%iger Salzsäure zur Abspaltung des Acetons kurz erhitzt. Die nach dieser Vorschrift erhaltene Lösung konnte dann direkt als Vergleichslösung weiter verwendet werden.

3.3 PC der L-Threonsäure

Der Nachweis der L-Threonsäure wurde pc erbracht; als Fließmittel dienten Essigsäureäthylester - Essigsäure-Wasser (10:1,3:1)(40). Dieses Fließmittel erwies sich als am besten geeignet für die direkte PC von Säuren. Die PC erfolgte aufsteigend^{*)}, die Laufzeit betrug 3 Std. nach Wasserdampfsättigung über Nacht (Rf -Wert 0,1). Das Sichtbarmachen erfolgte entweder durch 15 Min. langes Erhitzen auf 150° - 160°C (41) oder durch Besprühen mit Schweppe's

*) Es wurde immer die Papiersorte 2043 b Mgl der Firma Schleicher und Schüll, Dassel Krs.Einbeck, verwendet.

Reagenz (42), wobei in Umkehrung der Zuckerreaktion anstelle von Phthalsäure bzw. Phosphorsäure das Anilin mit einer Lösung von Xylose (oder Glukose) gemischt wurde. Es bildeten sich je nach der Säurekonzentration nach dem Besprühen mit Schweppe's Reagenz beim Erwärmen auf 105°C gelbe bis braune Flecke auf gelblichem Untergrund (Abb.4).

3.4 Überführung der Ketosäure-DNP-Hydrazone in die Aminosäuren (71).

Das Gemisch der Ketosäure-DNP-Hydrazone wurde, wie auf Seite beschrieben, gewonnen und in Essigester gelöst, diese Lösung nacheinander mit Natriumcarbonatlösung (10%) und Schwefelsäure (3n) ausgeschüttelt. Hierdurch wurden Reste von vielleicht noch vorhandenen neutralen Carbonylverbindungen sowie Verunreinigungen entfernt. Die erhaltene Lösung in Essigester wurde bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Alkohol (95 Vol%) aufgenommen. Diese gelbe alkoholische Lösung entfärbte sich durch Einleiten von trockenem HCl-Gas nach Zugabe von metallischem Zinn. Das Reaktionsgefäß befand sich hierbei in einem Eis-Bad. Die Lösung wurde filtriert, mit Wasser verdünnt und die im Überschuß vorliegenden Zinnionen durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt. Nach dem Entfernen des Schwefelwasserstoffs durch Eindampfen des Filtrates zur Trockne und der Aufnahme des Rückstandes mit dest. Wasser erfolgte die Reinigung der

Aminosäurelösung über Ionenaustauscher MERCK I. Die Lösung der mit n- Ammoniak gewonnenen Aminosäuren war nach dem Konzentrieren im Vakuum braun gefärbt, was jedoch die pc Untersuchung nicht störte.

3.5 Darstellung von Hydroxybrenztraubensäure.(75)

Zur Darstellung der Hydroxybrenztraubensäure wurden 4,27 g Dihydroxyaceton in 100 ml Wasser gelöst, die Lösung mit 35 g Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) versetzt und 3 Tage lang auf 80°C erwärmt. Nach dem Erkalten wurde der Überschuß an Kupfer(II)-ionen mit Thioharnstoff entfernt und das Filtrat direkt zur pc Vergleichsanalyse bzw. zur pc Isolierung der Hydroxybrenztraubensäure verwendet. Es genügte in diesem Falle die Herstellung einer Lösung der Substanz.

3.6 Herstellung der DNP-Hydrazon-Ketosäuremethylester.

Durch Zugabe von ätherischer Diazomethanlösung, deren Herstellung nach dem von GATTERMANN - WIELAND (60) angegebenen Verfahren erfolgte, zu den in Äther gelösten Ketosäure-DNP-Hydrazonen und den entsprechenden Blindproben (Brenztraubensäure-DNP-Hydrazon, Glyoxylsäure-DNP-Hydrazon) bildeten sich die DNP-Hydrazon-Ketosäuremethylester, die sich mit gelber Farbe in dem Äther lösten. Nach der Reinigung dieser Lösung durch aufeinanderfolgendes Schütteln

mit Natronlauge (1n), Salzsäure (1n) und dest. Wasser und darauffolgendes Trocknen mit Natriumsulfat erfolgte die dc Untersuchung: am vorteilhaftesten war die DC auf Kieselgel G MERCK mit dem Fließmittel Benzol, das 1% Essigester enthielt (Abb. 8).

3.7 Herstellung des Glykolsäure-4-bromphenazylesters.(49)

Die Veresterung der Glykolsäure mit 4-Bromphenazylbromid erfolgte durch Kochen des mit 0,5 n Natronlauge neutralisierten Reaktionsgemisches am Rückflußkühler. Beim Abkühlen der Lösung fielen die Kristalle von 4-Bromphenazylglykolat aus. Die mit Wasser gewaschene und getrocknete Verbindung hatte einen Schmelzpunkt von 122°C . Nach zweimaligem Umkristallisieren aus 90%igem Alkohol betrug der Schmelzpunkt $137-139^{\circ}\text{C}$.

In gleicher Weise wurde auch das 4-Bromphenazylglykolat einer authentischen Vergleichsprobe von Glykolsäure hergestellt. Schmelzpunkt 138°C .

Mischschmelzpunkt von beiden Verbindungen : 139°C .

3.8 DC des Glykolaldehyd-DNP-Hydrazons.

Als Sorbens bei der DC von Glykolaldehyd-DNP-Hydrazone wurde Kieselgel G MERCK verwendet. Als Fließmittel dienten Benzol (Rf-Wert = 0,08) und Toluol-Essigester (86:4) (Rf-Wert = 0,27). Bei der DC des Glykolaldehyd-DNP-Hydrazons auf Aluminiumoxid basisch für die DC WOELM mit dem Fließmittel

Toluol-Essigester (86:4) ergab sich ein Rf-Wert von 0,05.

3.9 Untersuchung des Niederschlages aus Lösung 2

3.9.1 Kupferbestimmung (58)

Die Bestimmung des Kupfers in dem Niederschlag erfolgte komplexometrisch durch Titration mit 0,01 m Titriplex(III)lösung und Murexid als Indikator.

Einwaage 12,2 mg/ 50 ml verd. Ammoniak

Verbrauch 0,806 ml/ 5 ml $\hat{=}$ 0,512 mg Kupfer.

Auf die Einwaage umgerechnet ergab sich ein Kupfergehalt von 42%.

3.9.2 Oxalatbestimmung (59)

Die Bestimmung des Oxalatanteils in dem Niederschlag erfolgte durch Titration mit 0,01 n Kaliumpermanganatlösung.

Einwaage 12,2 mg/ 50 ml verd. Ammoniak

Verbrauch 1,61 ml/ 5 ml $\hat{=}$ 0,707 mg Oxalat.

Diese Menge entspricht, auf die Einwaage bezogen, einem Oxalatgehalt von 57,8% in dem Niederschlag.

Bei einer Bestimmung dieser Bestandteile in einer Vergleichsprobe von Kupferoxalat wurden folgende Werte gefunden:
Kupfer: 41,2% , Oxalatgehalt 58%.

3.10 PC des Glyoxal-DNP-Hydrazons (91)

Das Glyoxal-DNP-Hydrazon der Analyse und dasjenige von authentischem Glyoxal wurden in Tetrahydrofuran gelöst und aufsteigend mit Dibutyläther - Dimethylformamid-Tetrahydrofuran (85:15:4) entwickelt. Laufzeit 5 Stunden nach Wasserdampfsättigung des Papiers in der Kammer über Nacht, Rf- Wert beider Substanzen 0,3. Beim Besprühen mit alkoholischer n- KOH färbten sich beide Flecke blau.

3.11 Bestimmung des Kohlendioxids (60)

Die quantitative Bestimmung des durch Oxydation von AS-Lösungen mit Kupfer(II)sulfat gebildeten Kohlendioxids erfolgte durch Absorption an Natronasbest. Der Natronasbest befand sich dabei in einem U-Rohr, das in bestimmten Zeitabständen gewogen wurde. Abb. 5 zeigt die Menge des entwickelten Kohlendioxids in Abhängigkeit von der Zeit.

3.12 Darstellung der L-Dehydroaskorbinsäure (DHA).

Die Darstellung der Vergleichssubstanz DHA durch Oxydation der AS ist nach mehreren Verfahren möglich. Es eignen sich dazu folgende Oxydationsmittel: Selendioxid (99), entweder in absolutem Methanol oder in Wasser, p-Chinon (100), Chlor (101), Jod (102) und Kupfer(II)-azetat (103). Von diesen Möglichkeiten wurde die Oxydation mit Selendioxid in absolut methanolischer Lösung ausgewählt:

8,8 g AS wurden in 100 ml absolutem Methanol gelöst, diese Lösung mit einer filtrierten Lösung von 2,7 g Selen-dioxid in 50 ml absolutem Methanol tropfenweise unter Umrühren versetzt. Nach dem Stehen über Nacht wurde von dem ausgeschiedenen roten Selen abfiltriert und das Filtrat, das keine positive Reaktion auf Selendioxyd mehr zeigen durfte (Zutropfen zu einer wässrigen Jodwasserstofflösung), unter Vakuum bei 20°C eingeeengt, bis der Methanol restlos entfernt war (Ölpumpe, Exsikkator). Es resultierte eine nahezu farblose, schaumige, trockene Masse, deren Reinigung nach der Methode von STAUDINGER und WEIS (104) vorgenommen wurde:

0,25 g rohe DHA wurden in 60 ml einer Lösung von 5% 0,2 n-Salzsäure in Eisessig eine halbe Minute lang gekocht und anschließend filtriert. Die Lösung blieb 15 Std. lang bei Raumtemperatur und eine Stunde lang bei -15°C stehen. Nachdem das Lösungsmittelgemisch wieder bei Zimmertemperatur geschmolzen war, wurde die ausgefallene DHA abgesaugt und mit viel Äther gewaschen.

Schmelzpunkt 232° - 235°C unter Zersetzung.

Die Ausbeute betrug nur 0,72 g $\cong$ 8,2% der theoretischen Ausbeute.

3.13 Darstellung der L-Lyxonsäure und L-Xylonsäure (105) (als Kalium-und Bariumsalze)

Als Ausgangsprodukte für die Herstellung der L-Lyxonsäure und der L-Xylonsäure dienten L-Lyxose bzw. L-Xylose;

diese Verbindungen wurden nach dem Verfahren von MOORE und LINK (105) oxydiert.

In einem Dreihalskolben (500 ml), der mit einem Rührer, Thermometer und Tropftrichter versehen und bis zur Hälfte in ein Wasserbad eingetaucht war, wurden 5,7 g Jod in 80 ml absolutem Methanol unter Umrühren bei 40°C gelöst.

1,7 g L-Lyxose wurden in der Wärme in 25 ml absolutem Methanol gelöst und nach dem Filtrieren auch in den Kolben gegeben. Unter Rühren erfolgte sofort danach die tropfenweise Zugabe von 65 ml einer 4%igen methanolischen Kalilauge innerhalb von 15 Min. Es wurde 10 Min. lang gerührt und nochmals 50 ml methanolische Kalilauge in der gleichen Weise zugegeben. Die Farbe der Lösung war jetzt hellgelb, denn das freie Jod war nahezu reduziert. Zum Schluß wurden noch einmal wenige ml Kalilauge zugefügt und das Reaktionsgemisch 10 Min. lang gerührt.

Das Kaliumsalz der L-Lyxonsäure setzte sich nach dem Erkalten an den Wänden und auf dem Boden des Gefäßes ab. Es wurde abgesaugt, zweimal mit absolutem Methanol und einmal mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

Aus dem Filtrat des Reaktionsgemisches ließ sich das Bariumsalz der L-Lyxonsäure leicht gewinnen: die Darstellung erfolgte durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von 5 g Bariumjodid ($\text{BaJ}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in 25 ml Methanol unter Rühren. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in der Zentrifuge zweimal mit Methanol gewaschen, in Äther suspendiert und

auf einer Nutsche gesammelt. Die letzten Reste des Äthers konnten im Vakuumexsikkator entfernt werden.

3.14 Darstellung der α - Ketobuttersäure

Die Darstellung der α -Ketobuttersäure, deren Anwesenheit vermutet wurde, verläuft über mehrere Stufen. Zunächst wurden zur Bildung von Propionylchlorid (106) 100 g Propionsäure und 78 g Phosphortrichlorid auf dem Wasserbad bis zum Aufhören der Gasentwicklung erwärmt. Da das nach der Fraktionierung erhaltene Propionylchlorid noch Phosphor enthält, wurde es mehrere Stunden lang mit wasserfreiem Natriumpropionat erhitzt und anschließend abdestilliert. Nachdem das Destillat nochmals in gleicher Weise behandelt worden war, ergab sich eine Ausbeute von 100 g Propionylchlorid (Kp 77° - 80°C), entsprechend 90% der theoretischen Ausbeute.

Aus dem Propionylchlorid wurde das Propionylzyanid hergestellt: es bildete sich bei längerem Erhitzen von 50 g Propionylchlorid mit 68 g Silberzyanid (107). Es ist eine farblose, leichte, dem Acetylzyanid ähnlich riechende Flüssigkeit, die bei 108° - 110°C siedet. Ausbeute 15 g, entsprechend 33% der theoretischen Ausbeute.

Die Verseifung des Propionylzyanids führte schließlich zur α -Ketobuttersäure (108): 30 g gut gekühlten Propionylzyanids wurden mit 18 g höchst konzentrierter Salzsäure

versetzt und das nach einiger Zeit erstarrte Gemisch eine halbe Stunde lang mit verdünnter Salzsäure ($d=1,1$) erwärmt. Die freie Säure wurde mit Äther extrahiert, über Calciumchlorid getrocknet und von beigemengter Propionsäure durch Fraktionierung im Vakuum befreit.

Kp₁₅ = 74°C, Ausbeute 3,6 g, entsprechend 10% der theoretischen Ausbeute. Kp₁₅ (Propionsäure) = 57°- 59°C.

3.15 Aufnahme der IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Gerät Modell 221, Bodenseewerk Perkin-Elmer u. Co, G.m.b.H., Überlingen/See, aufgenommen; KBr-Tabletten meist ca. 0,8 mg Substanz auf 300 mg KBr. *)

*) An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dr. Linde, Assistent am Pharmazeutischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, für seine Hilfe bei der Herstellung und Auswertung der IR-Spektren danken.

3.16 Messung der radioaktiven Abbauprodukte*)

Die Prüfung der Abbauprodukte, die sich in je 50 ml der Untersuchungslösungen 5 und 6 nach Zugabe von jeweils 25 μ C L-Ascorbinsäure ($^{14}\text{C}_1$) unter den in Kapitel 2.7 erwähnten Bedingungen bildeten, auf radioaktiven Kohlenstoff ^{14}C erfolgte mit einem 2 π -Methan-Durchflußzähler (Friesseke und Hoepfner, Erlangen-Bruck, FH 51, Zählspannung 3,9 KV, Diskriminatorstellung 10) und einem Zählgerät (Friesseke und Hoepfner, Erlangen-Bruck, Eingangsempfindlichkeit 110 mV).

Die Säuren (L-Threonsäure, Glykolsäure, Oxalsäure) wurden pc nachgewiesen und ihre Flecke aus den Chromatogrammen ausgeschnitten. Die Untersuchung der Carbonylverbindungen auf Radioaktivität erfolgte über ihre DNP-Hydrazone, und das Kohlendioxid wurde als Bariumcarbonat gefällt und in dieser Form mit den oben erwähnten Geräten auf ^{14}C geprüft. Die für diese Reaktionen verwendeten Reagenzien Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Bariumhydroxyd und 2,4-Dinitrophenylhydrazin hatten sich als nicht aktiv erwiesen.

*) Ich danke Herrn Diplomchemiker Rudolf Brüssau, Physikalisch-chemisches Institut der Universität Frankfurt am Main, für seine freundliche Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Messungen.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau der AS in wässriger Lösung verfolgt. Um einen Einblick in den Ablauf der Veränderungen des AS-Moleküls zu gewinnen, erfolgte die Zugabe von radioaktiv markierter AS ($^{14}\text{C}_1$). Zur Untersuchung dienten reine wässrige AS-Lösungen (Lösungen 1 und 5) und solche mit einem Zusatz von Kupfer(II)-sulfat (Lösungen 2 und 6).

Beide Untersuchungslösungen zeigten schon äußerlich während des Alterns auffällige Veränderungen: sie färbten sich zunächst gelb und anschließend tief gelbbraun, außerdem bekamen sie einen charakteristischen Geruch. Der pH-Wert nahm ab, desgleichen auch das Reduktionsvermögen. Ein Vergleich dieser Veränderungen in den Untersuchungslösungen zeigt, daß die Abbaureaktionen - wie erwartet - in den Lösungen 2 und 6 bedeutend schneller ablaufen als in den Lösungen 1 und 5.

In den gealterten Lösungen, die Kupfer(II)-ionen als Zusatz erhalten hatten, konnten andere Abbauprodukte als in den kupferfreien Ansätzen festgestellt werden. Sämtliche aufgetretenen Verbindungen wurden ermittelt. Sie lassen sich in Säuren und Carbonylverbindungen unterscheiden. Die letzteren können wieder in saure und neutrale Vertreter eingeteilt werden.

Eine Zusammenstellung der verschiedenen gefundenen Verbindungen wird in Tabelle 3 gebracht.

Tabelle 3 Übersicht über die gefundenen Abbauprodukte.

Lösungen 1 und 5 ohne Zusatz von Cu^{2+}	Lösungen 2 und 6 mit Zusatz von Cu^{2+}
L-Dehydroaskorbinsäure	L-Dehydroaskorbinsäure
2,3-Diketo-L-gulonsäure	2,3-Diketo-L-gulonsäure
Furfurol	L-Threonsäure
L-Threonsäure	Hydroxybrenztraubensäure
Hydroxybrenztraubensäure	Brenztraubensäure
Brenztraubensäure	Glyzerinaldehyd
Glyzerinaldehyd	Glykolaldehyd
Glykolaldehyd	Glykolsäure
Glykolsäure	Glyoxylsäure
Glyoxylsäure	Oxalsäure
Oxalsäure	Glyoxal
Glyoxal	Kohlendioxid

Die Methoden, die zur Identifizierung eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengestellt.

Tabelle 4 Identifizierung der Säuren

Säure	Identifizierung als
L-Threonsäure	p-Phenylphenazyl-L-threonat F = 102°-103°C
Glykolsäure	4-Bromphenazylglykolat F = 137°-139°C
Oxalsäure	1) Glyoxylsäure nach Reduktion 2) Glykolsäure nach Reduktion 3) Anilinblau 4) Quantitative Bestimmung von Kupfer und Oxalat (in Lsg. 2)
Kohlendioxid	Natriumcarbonat nach Absorption an Natronasbest

Die farblichen und geruchlichen Veränderungen der Lösungen 1 und 5 sowie der Lösungen 2 und 6 wurden durch die vorhandenen, verschiedenen Carbonylverbindungen hervorgerufen; nach deren Trennung in Säuren und neutrale Bestandteile und nachfolgende Überführung in die entsprechenden DNP-Hydrazone konnten folgende Verbindungen identifiziert werden:

Tabelle 5 Übersicht über die gefundenen Carbonylverbindungen

Säuren	Identifizierung durch	Neutrale Bestandteile	Identifizierung durch
Hydroxybrenztraubensäure	1. Direkte PC 2. DNP-Hydrazon 3. Aminierung zu Serin	Furfurol	1. DNP-Hydrazon rote und gelbe Form 2. Acetylverbindung der DNP-Hydrazone 3. IR-Spektroskopie
Brenztraubensäure	1. Direkte PC 2. DNP-Hydrazon 3. Aminierung zu α -Alanin	Glyzerinaldehyd	1. DNP-Hydrazon 2. IR-Spektroskopie
Glyoxylsäure	1. Direkte PC 2. DNP-Hydrazon 3. Aminierung zu Glykokoll	Glykolaldehyd	1. DNP-Hydrazon 2. IR-Spektroskopie
		Glyoxal	1. DNP-Hydrazon 2. IR-Spektroskopie

Bei den Alterungsversuchen der AS in gepufferter, neutraler und in gepufferter, alkalischer Lösung (pH 9,0), jeweils ohne Kupferzusatz, konnten nur DHA, DKS, L-Threonsäure, Glyoxal und Oxalsäure in beiden Proben gefunden werden. Die anderen Verbindungen, welche in den Lösungen 1 und 5 und in den Lösungen 2 und 6 außer diesen auftauchten, waren nicht nachweisbar.

Bei der Überprüfung von einigen AS-haltigen Industriepräparaten verschiedenen Alters (5 bis zu 22 Jahre) war der Nach-

weis der gefundenen Abbauprodukte nicht möglich.

Über den Bildungsweg der einzelnen Verbindungen wurden Überlegungen angestellt, nachdem der Abbau der AS mit Zusatz von markierter AS ($^{14}\text{C}_1$) unter beschleunigenden Bedingungen noch einmal wiederholt worden war.

Radioaktiv waren folgende Spaltprodukte:

Furfurol
L-Threonsäure
Glyoxylsäure
Glykolaldehyd
Glykolsäure
Glyoxal
Oxalsäure
Kohlendioxid.

5. Literaturverzeichnis

- (1) A.P. Grollmann Arch. Biochem. 69, 458 (1957)
A.L. Lehninger
- (2) R.N. Roy, Nature (London) 182, 319 (1958)
B.C. Guha
- (3) W.N. Haworth, Nature (London) 131, 225 (1933)
A. Szent-Györgyi
- (4) J. Lind Treatise on Scurvy
2nd Edition, A. Miller London 1757
- (5) A. Holst Journ. Hyg. 7, 619 (1907)
- (6) A. Holst, Journ. Hyg. 7, 634 (1907)
T. Fröhlich
- (7) A. Holst, Journ. Hyg. 72, 1 (1912)
T. Fröhlich
- (8) A. Szent-Györgyi Biochem. J. 22, 1387 (1927)
- (9) J.L. Svirbely Biochem. J. 26, 865 (1932)
A. Szent-Györgyi 27, 279 (1933)
- (10) E.L. Hirst u. Mitarb. J. Soc. Chem. Ind.
Chem. and Ind. 52, 221 (1933)
- (11) W.N. Haworth J. Soc. Chem. Ind.
Chem. and Ind. 52, 482 (1933)
- (12) P. Karrer, Helv. Chim. Acta 16, 1161 (1933)
K. Schöpp,
F. Zehnder

- (24) J. Kanfer, J. biol. Chem. 235, 2518 (1960)
G. Ashwell,
J.J. Burns
- (25) J. Kanfer et al. Federation Proceedings 18, 256 (1959)
- (26) C.O. Curtin J. biol. Chem. 216, 539 (1955)
C.G. King
- (27) S. Kamiya J. Vitaminol. 6, 240 (1960)
- (28) R. Strohecker, Z. Lebensm. Unters. u. Forsch.
H. Schmidt 86, 370 (1943)
- (29) E.A. Hill J. Amer. chem. Soc. 22, 478 (1900)
- (30) M.P. Lamben, Food Research 15, 79 (1950)
R.S. Harris
- (31) C.D. Hodgman Handbook of Chemistry and Physics
42nd Edition, 1960-1961, S. 1753
The Chemical Rubber Publishing Co,
Cleveland, Ohio
- (32) Deutsches 3. Nachtrag 1959 S. 74
Arzneibuch
6. Ausgabe 1926
- (33) J. Tillmans Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.
54, 33 (1927)
- (34) J.H. Roe J. Biol. Chem. 147, 399 (1943)
C.A. Kuether
- (35) M.Z. Barakat, Zeitschr. Anal. Chemie 152, 227 (1956)
M.F. Abd-El Wahab
M.M. El-Sadr

- (36) M. Z. Barakat, Anal. Chem. 27, 536 (1955)
M. F. Abd-El Wahab,
M. M. El-Sadr
- (37) J. Herrmann Nahrung 7, 243 (1963)
W. Andrae
- (38) E. L. Hirst, Nature (London) 129, 576 (1932)
J.R.W. Reynolds
- (39) W. H. Sebrell jr. The Vitamins, Vol. I
R. S. Harris Academic Press, New York 1954,
S. 185
- (40) I. M. Hais, Handbuch der Papierchromatographie
K. Macek Band I, VEB Gustav Fischer Verlag
Jena 1958 ,S. 252
- (41) K. Bina, Naturwissenschaften 43, 36 (1956)
J. Kalamer
- (42) H. Schweppe Dissertation Münster 1954
- (43) J. U. Nef, J. Amer. chem. Soc. 39, 1646 (1917)
O. F. Hedenburg,
J.W.E. Glattfeld
- (44) G. Scheuing, Chem. Ber. 82, 92 (1949)
W. Konz
- (45) N. L. Drake J. Amer. Chem. Soc. 54, 2060 (1932)
J. P. Sweeney
- (46) L. v. Vargha Nature (London) 130, 847 (1932)
- (47) E. Eegriwe Z. anal.Chem. 89, 123 (1932)
- (48) R. Grigee Liebig's Ann. Chem. 481, 282 (1930)

- (73) E. Kawerau, Nature (London) 168, 77 (1951)
Th. Wieland
- (74) I.P. Greenstein, Chemistry of the Amino Acids
M. Winitz Vol. 3 S. 2209
- (75) W.L. Evans, J. Amer. chem. Soc. 48, 2690
C.E. Waring (1926)
- (76) A.L. Levy, J. Amer. chem. Soc. 77, 2899 (1955)
D. Chung
- (77) G. Biserte, J. Chromatogr. 2, 225 (1959)
J.W. Hollemann, 3, 85 (1960)
J. Hollemann-Dehove
P. Sautière
- (78) H. Fraenkel-Conrat, Methods of Biochemical Analysis
J.J. Harris, Bd. II, S. 359
A.L. Levy herausgeg. von D. Glick
Interscience Pub. New York 1955
- (79) A. Meister, Anal. Chem. 28, 171 (1956)
P.A. Abendschein
- (80) E. Eegriwe Z. anal. Chem. 100, 34 (1935)
- (81) V.P. Calkins Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15,
762 (1943)
- (82) F.E. Hueelin Food Research 18, 633 (1953)
- (83) H. Schiff Ber. dtsh. chem. Ges. 20, 541
(1887)
- (84) H. Schiff Liebigs Ann. Chem. 239, 380 (1887)
- (85) A. Baeyer Ber. dtsh. chem. Ges. 5, 26 (1872)

- (86) E.F.L.J. Ault, J. Chromatogr. 9, 291 (1962)
- (87) H. Bredereck Ber. dtsh. chem.Ges. 65, 1836
(1932)
- (88) M. Busch, J. prakt. Chem. [2] 92, 5 (1915)
F. Achterfeldt,
R. Seufert
- (89) Beilstein's Hand- 3.Ergänzungswerk Band I 3.Teil
buch der Organ.Chemie S. 3286
4. Auflage
- (90) Beilstein's Hand- 3. Ergänzungswerk Band I 3. Teil
buch der Organ.Chemie S. 3180
4. Auflage
- (91) W.J. Schmitt, Analyt. Chem. 28, 249 (1956)
E.J. Moriconi,
W.F. O'Connor
- (92) C. Neuberg, Biochem. Z. 256, 488 (1932)
E. Simon
- (93) G. Casnati, Gazz. chim. ital. 89, 615 (1959)
B. Cavalleri
- (94) N.M. Cullinane, J. chem. Soc. (London) 1958, 1311
B.F.R. Edwards
- (95) C.H. de Puy, J. Amer. chem. Soc. 81, 4629 (1959)
B.W. Ponder
- (96) E. Tommila Suomen Kem. 7B, 85 (1934)
- (97) T. Reichstein Helv. Chim. Acta 18, 602 (1935)
- (98) W. Feldheim, Z. anal. Chem. 162, 193 (1958)
M. Czerny

- (99) R. Pohloudek-Fabini Arch. Pharmaz. 292, 350 (1959)
- (100) R. Pohloudek-Fabini Arch. Pharmaz. 292, 64 (1959)
- (101) B. Pecherer J. Am. Soc. 1951, 3827
- (102) J. Kenyon, J. Chem. Soc. (London) 1948, 158
N. Munro
- (103) P. Karrer, Biochem. Z. 258, 4 (1933)
H. Salomon,
R. Morf,
K. Schöpp
- (104) H.J. Staudinger, Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 337,
W. Weis 284 (1964)
- (105) S. Moore, J. biol. Chem. 133, 293 (1940)
K.P. Link
- (106) A. Michael Ber. dtsch. chem.Ges. 34, 4047
(1901)
- (107) L. Claisen, Ber. dtsch. chem.Ges. 13, 2121
E. Moritz (1880)
- (108) L. Claisen, Ber. dtsch. chem.Ges. 13, 2122
E. Moritz (1880)
- (109) F. Feigl Tüpfelanalyse Bd. II Organ. Teil
Akadem. Verlagsgesellschaft m.b.H.
Frankfurt am Main 1960 S. 433
- (110) F.W. Küster, Logarithmische Rechentafeln
A. Thiel, 74.-83. Auflage, de Gruyter u.Co,
K. Fischbeck Berlin 1958, S. 147,148.

- (111) N. G. Levandoski, Federation Proceed. 22,437 (1963)
E. M. Baker,
W. C. Stickler

- (112) M. Loury C.R. hebd. Séances Acad.Sci.
253, 2717 (1962)
255, 2456 (1962)
256, 2870 (1963)
258, 238 (1964)

Herrn Prof. Dr. H. Janecke, meinem hochverehrten
Lehrer und Doktorvater, möchte ich für seine An-
regung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen Dank
aussprechen.

Meinem hochverehrten Lehrer, dem Direktor des
Pharmazeutischen Institutes, Herrn Prof. Dr. C. Rohmann,
danke ich für seine Unterstützung und freundliches
Entgegenkommen.

Lebenslauf

Am 8. März 1934 wurde ich, Dieter Osthoff, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Wilhelm Osthoff und dessen Ehefrau Martha, geb. Timmerhoff, in Dortmund geboren. Ich besuchte die Volksschule in Dortmund-Barop und in Jugenheim/Bergstraße. Nach dem Besuch des Liebigrealgymnasiums in Darmstadt von Herbst 1945 an legte ich daselbst im Frühjahr 1954 die Reifeprüfung ab. Im März 1956 bestand ich nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Berchermann'schen Apotheke in Pfungstadt die pharmazeutische Vorprüfung. Im Wintersemester 1956/57 begann ich das Pharmaziestudium an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main und legte im Sommer 1959 die pharmazeutische Staatsprüfung ab. Anschließend arbeitete ich in der Apothekenpraxis und erhielt im Herbst 1960 die Approbation als Apotheker. An dem Pharmazeutischen Institut der J.W.Goethe-Universität (Direktor: Prof. Dr. C. Rohmann) setzte ich ab November 1961 meine Studien fort und fertigte unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Janecke meine Dissertation an.

